

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000075

International filing date: 10 January 2005 (10.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2004-0001695  
Filing date: 09 January 2004 (09.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.**

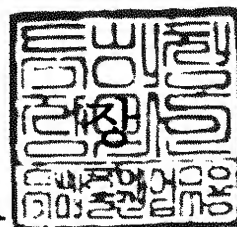
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0001695 호  
Application Number 10-2004-0001695

출 원 년 월 일 : 2004년 01월 09일  
Date of Application JAN 09, 2004

출 원 인 : 재단법인 목암생명공학연구소  
Applicant(s) MOGAM BIOTECHNOLOGY INSTITUTE

2005 년 1 월 24 일

특 허 청  
COMMISSIONER



# 【서지사항】

|            |   |
|------------|---|
| 【서류명】      | 특허출원서   |
| 【권리구분】     | 특허  |
| 【수신처】      | 특허청장  |
| 【제출일자】     | 2004.01.09  |
| 【발명의 명칭】   | 인간 아포리포단백질(a) 크링글 L K 68 또는 L K 8 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암용 유전자 치료제 및 상기 유전자를 이용한 암 치료방법   |
| 【발명의 영문명칭】 | Gene-therapeutic agent for anticancer comprising human apolipoprotein(a) kringles LK68 or LK8 genes as effective ingredient, and therapeutic method of cancer using the genes |
| 【출원인】      |   |
| 【명칭】       | 재단법인 목암생명공학연구소  |
| 【출원인 코드】   | 3-1998-006148-4   |
| 【대리인】      |   |
| 【성명】       | 이원희   |
| 【대리인 코드】   | 9-1998-000385-9   |
| 【포괄위임등록번호】 | 1999-033454-7   |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 이규현   |
| 【성명의 영문표기】 | LEE, Kyuhyun  |
| 【주민등록번호】   | 760610-1025511  |
| 【우편번호】     | 139-220   |
| 【주소】       | 서울특별시 노원구 중계동 505 롯데아파트 11동 307호  |
| 【국적】       | KR  |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 유현경   |
| 【성명의 영문표기】 | YU, Hyunkyoung  |
| 【주민등록번호】   | 740330-2251228  |
| 【우편번호】     | 441-480   |
| 【주소】       | 경기도 수원시 권선구 당수동 439   |
| 【국적】       | KR  |

【발명자】

【성명의 국문표기】 이호정  
【성명의 영문표기】 LEE, Ho-Jeong  
【주민등록번호】 740911-2222415  
【우편번호】 449-840  
【주소】 경기도 용인시 수지읍 동천마을 현대2차 홈타운 202동 1602호  
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 임병필  
【성명의 영문표기】 LIM, Byung-Pil  
【주민등록번호】 710713-1398714  
【우편번호】 449-170  
【주소】 경기도 용인시 풍덕천동 1167번지 삼성5차아파트 526동 1201호  
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 안진형  
【성명의 영문표기】 AHN, Jin-Hyung  
【주민등록번호】 721229-1350913  
【우편번호】 449-846  
【주소】 경기도 용인시 수지읍 풍덕천동 660-5 304호  
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김장성  
【성명의 영문표기】 KIM, Jang-Seong  
【주민등록번호】 680207-1473511  
【우편번호】 442-400  
【주소】 경기도 수원시 팔달구 망포동 690번지 망포마을 동수원 LG빌리지 201 동 103호  
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조의철  
【성명의 영문표기】 JO, Eui-Cheol

|                    |  |           |  |
|--------------------|--|-----------|--|
| 【주민등록번호】           | 591014-1058116   |           |  |
| 【우편번호】             | 443-470  |           |  |
| 【주소】               | 경기도 수원시 영통구 영통동 969-1 태영아파트<br>933-1803호                               |           |  |
| 【국적】               | KR   |           |  |
| 【발명자】              |  |           |  |
| 【성명의 국문표기】         | 윤엽   |           |  |
| 【성명의 영문표기】         | Y00N, Yeup   |           |  |
| 【주민등록번호】           | 601016-1017319   |           |  |
| 【우편번호】             | 427-010  |           |  |
| 【주소】               | 경기도 과천시 중앙동 주공APT 104동 103호  |           |  |
| 【국적】               | KR   |           |  |
| 【발명자】              |  |           |  |
| 【성명의 국문표기】         | 박두홍  |           |  |
| 【성명의 영문표기】         | PARK, Doo-Hong   |           |  |
| 【주민등록번호】           | 561115-1024814   |           |  |
| 【우편번호】             | 137-062  |           |  |
| 【주소】               | 서울특별시 서초구 방배동 2754-3   |           |  |
| 【국적】               | KR   |           |  |
| 【심사청구】             | 청구   |           |  |
| 【핵산염기 및 아미노산 서열목록】 |  |           |  |
| 【서열개수】             | 11   |           |  |
| 【서열목록의 전자파일】       | 첨부   |           |  |
| 【취지】               | 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규<br>정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인<br>이원희 (인) |           |  |
| 【수수료】              |  |           |  |
| 【기본출원료】            | 60 면   | 38,000 원  |  |
| 【가산출원료】            | 0 면  | 0 원       |  |
| 【우선권주장료】           | 0 건  | 0 원       |  |
| 【심사청구료】            | 15 항   | 589,000 원 |  |
| 【합계】               | 627,000 원  |           |  |

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 항암용 유전자 치료제에 관한 것으로, 구체적으로는 인간 아포리포단백질 (a) 크링글 (kringle) KIV9-KIV10-KV (LK68) 또는 KV (LK8) 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암용 유전자 치료제 및 상기 유전자를 이용한 암 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 유전자 치료제는 종양의 생장억제 및 전이억제 효과가 있으므로, 암전이 억제제 또는 원발 종양의 치료제 등 다양한 고형암의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

### 【대표도】

도 1

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

인간 아포리포단백질 (a) 크링글 L K68 또는 L K8 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암용 유전자 치료제 및 상기 유전자를 이용한 암 치료방법 {Gene-therapeutic agent for anticancer comprising human apolipoprotein(a) kringles LK68 or LK8 genes as effective ingredient, and therapeutic method of cancer using the genes}

### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 재조합 바이러스를 사용하여 LK68 또는 LK8 유전자가 도입된 결장암 세포주의 제조과정을 나타낸 모식도 및 사진으로, 아포리포단백질 (a) 내 LK68 및 LK8 단백질의 위치와 각각 LK68 및 LK8 단백질을 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 벡터 pLXSN-LK68 및 pLXSN-LK8의 모식도 (A), 및 재조합 바이러스로 감염된 결장암 세포주에서 LK68 단백질과 LK8 단백질의 발현 여부를 웨스턴 블롯 (Western blot) (B) 과 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) (C) 을 사용해서 확인한 사진이고,

도 2는 LK68 또는 LK8 유전자의 도입이 표적세포 자체의 성장 및 세포사멸에는 영향을 미치지 않음을 확인하기 위하여, 도 1에서 제조된 재조합 결장암 세포주의 실험실 조건 (*in vitro*)에서의 성장을 트립판블루 (trypan blue) 를 사용하여 계수한 그래프 (A) (이때, Y축은 세포의 수를, X축은 관찰한 시간을 나타낸다), 및 도 1에서 제조된 재조합 결장암 세포주의 사멸을 아넥신 V (annexin-V) 와 PI (propidium iodide)

염색을 통한 FACS 실험의 수행으로 관찰한 그래프 (B) 이고 (이때, 양성 대조군은 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 택솔 (taxol) 을 처리하였다),

CT-mock : LK68 유전자가 도입되지 아니한 대조군 세포주,

CT-vector : LK68 유전자 없이 플라스미드만을 형질도입한 세포주,

CT-LK68 : LK68 유전자가 도입된 결장암 세포주,

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Taxol : CT-mock 대조군 세포주에 택솔을 처리한 양성대조군,

도 3은 생쥐 (Balb/c) 의 피하에 이식한 결장암 세포주의 생장을 관찰하기 위하여, 각각의 세포주의 이식 후 시간 경과에 따른 고형암의 생장을 나타내는 그래프 (A) (이때, 실험결과의 통계학적 유의성은 스튜던트 t-테스트 방법으로 검정하였고 (\*:  $p < 0.0005$ ), Y축은 [길이 (length) x 나비 (width)<sup>2</sup> x 0.52]식에 의거하여 산출된 암의 부피이고, X축은 암이식후 경과일을 나타낸다), 및 결장암 세포주 배양 최종일에 상기 생쥐로부터 분리된 고형암의 사진 (B)과 고형암의 무게를 나타낸 그래프 (C) 이고,

CT-mock : LK68 유전자가 도입되지 아니한 대조군 세포주,

CT-vector : LK68 유전자 없이 플라스미드만을 형질도입한 세포주,

CT-LK68: LK68 유전자가 도입된 결장암 세포주,

도 4는 결장암 세포의 비장으로 주입 후 간으로의 전이를 유도하는 경우에 있어서, LK68 또는 LK8 유전자가 도입된 결장암 세포는 대조군 결장암 세포에 비해 전이가 억제됨을 확인하기 위하여, 결장암 세포의 간으로의 전이 정도를 비교한



사진 (A) , 및 간으로의 전이억제 정도를 간 표면에 생성된 전이암 수를 계수하여 나타낸 그래프 (B) 이고 ,

CT-vector : LK68 또는 LK8 유전자 없이 플라스미드만을 형질도입한 세포주 ,

CT-LK68 : LK68 유전자가 도입된 결장암 세포주 ,

CT-LK8 : LK8 유전자가 도입된 결장암 세포주 ,

도 5는 LK68 유전자 도입된 결장암 세포 (CT-LK68) 의 경우 대조군 (CT-vector) 에 비해 생성된 혹 (nodule) 의 수 및 크기가 전체적으로 현저히 감소하고 , 대조군에 비해 암세포의 증식력에는 변화가 없으나 세포사멸은 현저히 증가됨을 확인하기 위하여 , 전이가 발생한 간의 대표적인 부분을 조직학적 또는 면역조직화학적 방법으로 염색하여 나타낸 결장암 세포가 전이된 간의 조직화학적 분석 사진 (A) (이때 , 전반적인 암의 전이 정도를 관찰하기 위해서 H&E 염색을 , 암세포의 증식정도와 사멸정도를 관찰하기 위해서 PCNA 염색과 TUNEL 염색을 수행하였다) , 및 PCNA 염색과 TUNEL 염색의 결과를 전체 세포 중 각각의 염색에 양성으로 반응한 세포의 수를 계수한 후 상대적 비율을 백분율로 나타낸 그래프 (B 및 C) 이고 (이때 , 실험 결과의 통계적 유의성은 스튜던트 t-테스트 방법으로 검정하였다) ,

도 6은 결장암 세포의 간전이 모델에서 LK68 유전자가 도입된 결장암 세포는 대조군에 비해 간으로의 전이가 억제되고 숙주의 생존률도 증가됨을 확인하기 위하여 , 대조군 (CT-vector) 과 LK68 유전자가 도입된 결장암 세포 (CT-LK68) 의 생존율을 나타내는 그래프이고 (이때 , 실험 결과의 통계적 유의성은 카플란 (Kaplan-Meier) 생존곡선의 로그 랭크 테스트 (log rank test) 방법으로 검정하였다) ,

도 7은 복강전이 (peritoneal dissemination) 모델에서 LK68 유전자가 도입된 결장암 세포는 대조군에 비해 복강으로의 전이가 억제되고 숙주의 생존률도 증가됨을 확인하기 위하여, 대조군 (CT-vector) 과 LK68 유전자가 도입된 결장암 세포 (CT-LK68) 의 생존율을 나타내는 그래프이고 (이때, 실험 결과의 통계적 유의성은 카플란 생존곡선의 로그 랭크 테스트 방법으로 검정하였다),

도 8은 LK68 또는 LK8 단백질의 카르복실기 말단 부위에 FLAG 항원을 붙이고, 상기 FLAG를 코딩하는 염기서열을 포함한 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응 (PCR) 을 통해 LK68 및 LK8 유전자의 증폭 과정을 나타내기 위하여, LK68 또는 LK8 유전자를 포함한 벡터의 개열지도, PCR을 수행하여 상기 벡터를 증폭한 뒤 아가로스 겔 전기영동으로 확인한 사진, 및 FLAG를 코딩하는 염기서열을 나타낸 모식도이고,

도 9는 증폭한 LK68과 LK8 cDNA를 아데노 부속 바이러스 전달 플라스미드 벡터에 클로닝하는 과정을 나타낸 모식도 및 이를 확인하는 아가로스 겔 전기영동사진이고,

도 10은 도 9의 클로닝 과정을 통해 제조된 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체 제조용 전달플라스미드의 각 유전자의 위치를 나타낸 개열지도이고,

도 11은 도 10에서의 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체 제조용 전달 플라스미드를 생체외 조건에서 형질도입하여 LK68과 LK8 단백질의 발현을 웨스턴 블롯 (western blot)으로 확인한 사진 (A), 및 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체 제조용 전달 플라스미드와 헬퍼 플라스미드 (helper plasmid) 의 형질도입을 통해 만들어진 재조합 아데노 부속 바이러스를 시험관 내에서 감염시켜 LK68과 LK8 단백질의 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 사진 (B) 이고,

도 12는 아포리포단백질 (a) 의 38번째 크링글 (kringle) 인 LK8 유전자 (A) , LK68 유전자 (B) 또는 안지오스타틴 (K13) 유전자 (C) 를 포함하는 재조합 아데노 부속 바이러스를 Ba1b/c 누드 생쥐의 뒷다리 근육에 주사하여 혈액내 발현양상을 나타내는 그래프와 웨스턴 블롯 사진 (A, B, C) , 및 LK68 또는 LK8 유전자를 포함하는 플라스미드의 유체 역학적 주입에 의한 C57BL/6 정상 생쥐에서의 혈액내 상기 유전자의 발현을 나타내는 그래프 (D) 이고,

도 13은 재조합 AAV 바이러스에 의하여 체내 LK68 또는 LK8 단백질이 분비되는 생쥐에서 B16F10 세포의 LK68 및 LK8 단백질이 폐로 전이되는 진행성 전이암의 억제를 나타내는 사진 (A) 과 그래프 (B) 이다.

**【발명의 상세한 설명】**

**【발명의 목적】**

**【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<24> 본 발명은 항암용 유전자 치료제에 관한 것으로, 구체적으로는 인간 아포리포단백질 (a) 크링글 (kringle) 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암용 유전자 치료제 및 상기 유전자를 이용한 암 치료방법에 관한 것이다.

<25> 종양은 비정상적이고 비제어성이며 무질서한 세포증식의 산물이다. 이러한 종양이 파괴적인 성장성, 침습성 및 전이성이 있다면 악성으로 분류된다. 침습성이란 주위 조직을 침윤 또는 파괴하는 성질로서, 일반적으로 조직의 경계를 이루는 기저층

을 파괴시켜 종양이 국부적으로 전파되는 것을 의미하며, 종종 체내의 순환계로도 유입된다. 전이란 일반적으로 림프관(lymphatic) 또는 혈관에 의해 원발 위치와는 다른 곳으로 종양 세포가 퍼지는 것을 의미한다. 전이는 또한 장액성 체강 또는 다른 공간을 통해 직접 신장하여 종양 세포를 이동시키는 것을 의미하기도 한다.

<26> 현재, 암은 주로 3가지 치료법, 즉 외과적인 수술, 방사선조사 및 화학요법 중 1가지 또는 이들의 조합을 통해 치료되고 있다. 수술은 질병 조직을 대부분 제거하는 것을 포함한다. 이러한 외과적 수술은 특정 부위, 예컨대 유방, 결장 및 피부에 위치한 종양을 제거하는 데에는 효과적이지만, 척추와 같이 일부 구역에 있는 종양을 치료하거나 백혈병과 같은 분산성 종양 질환을 치료하는 데는 사용할 수 없다.

<27> 화학요법은 세포 복제 또는 세포 대사를 붕괴시키며, 흔히 유방, 폐 및 정소의 암을 치료하는데 많이 사용되는데, 종양 질병을 치료하는데 사용되는 전신성 화학요법의 부작용은 암 치료를 받는 환자들에게 가장 문제가 된다. 이러한 부작용 중에서 멀미와 구토는 가장 일반적이며 심각한 부작용이다. 화학요법에 의한 부작용은 환자의 생명에 큰 영향을 미치며 치료에 대한 환자의 순응성을 급격하게 변화시킬 수 있다. 또한, 화학치료제와 관련된 부작용으로는 일반적으로 이러한 약물의 투여시 주의해야 하는 주용량 제한 독성(DLT)이 있다. 예를 들어, 점막염은 여러 항암제, 예컨대 항대사물질 세포독소제인 5-플루오로우라실, 메토트렉세이트 및 항종양 항생제(예, 독소루비신) 등에 대한 주용량 제한 독성이다. 이러한 화학요법 유래의 부작용 중 대부분은 심한 경우 입원을 요하거나 통증을 치료하기 위해 진통제를 필요로

하기도 한다. 이와 같이 화학치료제 및 방사선 치료에 의한 부작용들은 암 환자의 임상적 처치시 주요 문제가 되고 있다.

<28>        크링글 (kringle)은 약 80개의 아미노산과 세 개의 분자내 이황화 결합으로 구성된 단백질의 구조영역이다. 크링글 구조는 안지오스테틴 (O'Reilly, M.S. *et al.*, *Cell*, **79**:315-328, 1994), 프로트롬빈 (Walz, D.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**:1069-1073, 1977), 유로키나제 (Pennica, D. *et al.*, *Nature*, **301**:579-582, 1983), 간세포 성장인자 (Lukker, N.A. *et al.*, *Protein Eng.*, **7**:895-903, 1994) 및 아포리포단백질 (a) (apolipoprotein (a)) (McLean, J.W. *et al.*, *Nature*, **330**:132-137, 1987) 등과 같은 다수의 단백질에서 발견된다. 크링글 영역은 독립적인 접힘 단위 (folding unit)로 구성되며 그의 기능적인 역할은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 하지만, 크링글 구조를 갖는 단백질 등의 다양한 기능 때문에, 크링글 구조는 공통적인 기능을 갖지 않을 것으로 인식되어 왔다.

<29>        생체내에서 유일하게 간에서만 생산되는 당단백질의 일종인 아포리포단백질 (a)도 역시 다수의 크링글 구조를 포함하고 있다.

아포리포단백질 (a) 는 저밀도 리포단백질 (LDL) 의 주요 단백질 성분인 아포 B-100과 공유적으로 결합하여 리포단백질 (a) (lipoprotein(a)) 를 형성한다 (Fless, G.M., ., 261: 8712-8717, 1986) . 리포단백질 (a) 는 생체 내에서 콜레스테롤 운반을 담당하는데, 혈장에서의 리포단백질 (a) 농도 증가는 단독적으로도 동맥경화 (atherosclerosis) 및 심장질환의 주 위험인자로 보고되었으며 (Armstrong, V.W. ., *Atherosclerosis*, 62: 249-257, 1986; Assmann, G., *Am. J. Cardiol.*, 77: 1179-1184, 1996) , 리포단백질 (a) 의 역할은 대부분 아포리포단백질 (a) 를 매개로 이루어진다고 보고되었다. 아포리포단백질 (a) 는 플라스미노젠 크링글 IV 및 V와 유사성을 보이는 두 종류의 크링글 영역과 비활성의 단백질 분해효소-유사 (protease-like) 영역을 포함하고 있다. 아포리포단백질 (a) 크링글 IV-유사 영역은 아미노산 서열의 상동성에 의해 다시 10종의 아형 (subtype: IV1 내지 IV10) 으로 나누어지며, 각각은 하나씩 존재하지만 IV2 크링글은 아포리포 (a) 유전자의 다양한 인간 대립유전자에 3 내지 42개의 복제수 (copy number) 로 존재한다. 그리고, 마지막 크링글 V은 플라스미노젠 크링글-5와 83.5%의 아미노산 서열 상동성을 가진다.

<30>

본 발명자들은 2003년에 LK8 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암제를 출원한 바 있다 (대한민국 특허출원번호: 제2003-10797호) . 하지만, 고형암이나 전이암은 생체 내에서 장기간 휴지기 (dormant stage) 를 거처도 다시 성장할 수 있는 능력이 있는 반면에 단백질을 이용한 항암제는 생체 내 반감기가 상대적으로 짧다. 따라서, 유효한 항암효능을 보이기 위해서는 다량의 단백질을 장기간 반복적으로 투여하여 종양에서의 국소적인 항암단백질 농도를 일정수준 이상으로 유지시켜 주어야 한다. 따라

서, 이 방법은 다량의 단백질을 필요로 하므로 이를 생산할 수 있는 설비 및 기술이 확충되어야 하고, 생산이 가능하다 하더라도 이는 환자와 생산자 모두에게 비용이 많이 소요된다. 또한, 환자의 입장에서 보면 장기간 약물을 반복투여 하는 것은 번거로운 일이며, 항암용 단백질은 대부분 독성이 없는 것으로 알려져 있으나 이들 단백질이 대부분 미생물을 이용하여 생산된 재조합 단백질이기 때문에 다량으로 장기간 투여할 경우 상기 재조합 단백질의 생산시에 엔도독신 (bacterial endotoxin) 등에 오염될 수 있고, 이 경우 상기 독신이 독성을 나타낼 위험이 상존하고 있다. 결국 단백질을 이용한 항암제 개발을 위해서는 이러한 문제점들을 해결하여야 한다.

<31> 이에, 본 발명자들은 단백질을 코딩하는 유전자를 이용한 유전자 치료법은 비교적 손쉽게 전신성 또는 종양에서의 국소적인 항암용 단백질의 유효농도를 지속적으로 유지시킬 수 있다는 장점이 있기 때문에 단백질 치료법의 단점을 극복할 수 있는 유용한 대체방법이라 판단하고, 인간 아포리포단백질 (a) 크링글 KIV9-KIV10-KV (LK68) 및 KV (LK8) 유전자를 생체외 조건 (*ex vivo*)에서 결장암 세포에 전달하고 이 세포주를 이용한 동물실험에서 이들 유전자의 전달이 종양의 성장과 전이를 효과적으로 감소시킬 수 있다는 사실을 발견하고, LK68 유전자 및 LK8 유전자를 항암용 유전자 치료제로 이용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<32>        본 발명의 목적은 인간 아포리포단백질 (a) 크링글 (kringle) 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 및 전이억제용 유전자 치료제를 제공하는 것이다.

<33>        본 발명의 또 다른 목적은 상기 크링글 유전자를 이용한 고형암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<34>        상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인간 아포리포단백질 (a) 크링글 (kringle) KIV9-KIV10-KV (LK68) 또는 KV (LK8) 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 전이억제용 유전자 치료제를 제공한다.

<35>        또한, 본 발명은 상기 LK68 또는 LK8 유전자를 이용한 고형암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

<36>        이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

<37>        본 발명은 인간 아포리포단백질 (a) 크링글 (kringle) KIV9-KIV10-KV (LK68) 또는 KV (LK8) 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 전이억제용 유전자 치료제를 제공한다.

<38>        이때, 상기 LK68 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열인 것이 바람직하고, 유효성분으로 LK68 유전자를 포함하고 인체 또는 동물세포에서 발현되는 레트로바이러스 (retrovirus) 벡터, 아데노 바이러스 (adenovirus) 벡터, 아데노 부속



바이러스 (adeno-associated virus, AAV) 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 (herpes simplex virus) 벡터, 렌티바이러스 (lentivirus) 벡터, 플라스미드, 조혈 줄기세포 (hematopoietic stem cells), 수지상 세포 (dendritic cells), 자가이식 종양세포 (autologous tumor cells) 및 정착 종양세포 (established tumor cells)로 구성된 군으로부터 선택된 치료제인 것이 보다 바람직하고, pSecTag-LK68, pLXSN-LK68, rAAV-LK68 및 pAAV-LK68로 이루어진 벡터 또는 바이러스로부터 선택된 치료제인 것이 가장 바람직하다.

<39> 또한, 상기 LK8 유전자는 **서열번호 2**로 기재되는 염기서열인 것이 바람직하고, 유효성분으로 LK8 유전자를 포함하고 인체 또는 동물세포에서 발현되는 레트로바이러스 벡터, 아데노 바이러스 벡터, 아데노 부속 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 플라스미드, 조혈 줄기세포, 수지상 세포, 자가이식 종양세포 및 정착 종양세포로 구성된 군으로부터 선택된 치료제인 것이 보다 바람직하고, pSecTag-LK8, pLXSN-LK8, rAAV-LK8 및 pAAV-LK8로 이루어진 벡터 또는 바이러스로부터 선택된 치료제인 것이 가장 바람직하다.

<40> 또한, 상기 치료제는 체중 1 kg당 플라스미드 또는 벡터의 경우에는 0.05 ~ 12.5 mg/kg, 바이러스의 경우에는  $10^7 \sim 10^{11}$  바이러스 입자 ( $10^5 \sim 10^9$  IU) /kg, 세포의 경우에는  $10^3 \sim 10^6$  세포 /kg로 투여되는 것이 바람직하고, 플라스미드 또는 벡터의 경우에는 0.1 ~ 10 mg/kg, 바이러스의 경우에는  $10^8 \sim 10^{10}$  바이러스 입자 ( $10^6 \sim 10^8$  IU) /kg, 세포의 경우에는  $10^2 \sim 10^5$  세포 /kg로 투여되는 것이 보다 바람직하다.

<41> 또한, 상기 치료제는 플라스미드 또는 벡터의 경우에는 정맥주사로 1회 또는 2~10회 반복투여, 바이러스의 경우에는 근육주사, 정맥주사, 피하주사 및 간문맥내

주사로 구성된 군으로부터 선택된 투여로 1회 또는 2~10회 반복투여, 세포의 경우에는 정맥 주사로 1회 또는 2-10회 반복 투여하는 것이 바람직하다.

<42>       상기 바이러스를 이용한 치료는 아데노 바이러스, 재조합 아데노 바이러스 (AAV, adeno-associated virus)인 것이 바람직한데, 치료를 위한 상기 바이러스의 수는 벡터 계놈을 포함한 바이러스 입자 내지는 감염 가능한 바이러스 수로 나타낼 수 있다. 즉, 바이러스 입자의 1% 내외가 실제로 감염 가능한 바이러스의 유효 개수이므로, 이를 나타내기 위하여 IU (infection unit) 또는 PFU (plaque forming unit)를 사용한다.

<43>       한편, 세포를 이용한 치료는 재조합 레트로바이러스를 이용한 치료에 적용될 수 있다. 예를 들어, 재조합 레트로바이러스의 경우, 혈중 보체 (complement)에 의하여 상기 바이러스가 대부분 불활성화되므로, 생체 전달 (*ex vivo*)의 치료법을 사용한다. 구체적으로, 상기 LK68 또는 LK8 유전자를 포함하는 재조합 레트로바이러스를 제조하고, 상기 바이러스를 이용하여 사람의 조혈 줄기세포 (CD34+)에 유전자를 전달하고, 상기 세포를 인체에 투여하여 질병을 치료할 수 있다. 이때, 상기 이용가능한 세포는 조혈 줄기세포 이외에 수지상 세포, 자가이식 종양세포 (autologous tumor cells), 정착 종양세포 (established tumor cells) 등을 대용할 수 있다. 본 발명의 다수의 실시예에서는 정착 종양세포에 해당하는 CT26 세포주에 레트로바이러스를 사용하여 LK68 또는 LK8 유전자를 전달하고, 상기 세포를 생체내에 투여하여 질병의 진행을 관찰한 바 있다.

<44> 또한, 상기 치료제는 암 전이 억제 또는 원발 종양의 치료에 사용되는 것이 바람직하고, 상기 암은 결장암, 간암, 폐암, 유방암, 뇌종양, 전립선암, 피부암, 위암, 췌장암, 신장암 및 난소암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 보다 바람직하다.

<45> 본 발명의 LK68 또는 LK8 유전자를 포함하는 유전자 치료제는 임상 투여시에 비경구로 투여가 가능하며, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

<46> 즉, 본 발명의 치료제는 실제 임상 투여시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 또한, 치료제로서의 효능 증진을 위해 칼슘이나 비타민 D<sub>3</sub>를 첨가할 수 있다.

<47> 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배로, 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

<48>        상기 치료제의 유효용량은 체중 1 kg당 플라스미드 또는 벡터의 경우에는 0.05 ~ 12.5 mg/kg, 바이러스의 경우에는  $10^7 \sim 10^{11}$  바이러스 입자 ( $10^5 \sim 10^9$  IU) /kg, 세포의 경우에는  $10^3 \sim 10^6$  세포/kg이고, 바람직하게는 플라스미드 또는 벡터의 경우에는 0.1 ~ 10 mg/kg, 바이러스의 경우에는  $10^8 \sim 10^{10}$  바이러스 입자 ( $10^6 \sim 10^8$  IU) /kg, 세포의 경우에는  $10^2 \sim 10^5$  세포/kg이며, 하루 2-3 회 투여될 수 있다. 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 신경 질환의 발병 정도에 따라 변할 수 있다.

<49>        본 발명자들은 LK68 단백질 및 LK8 단백질이 시험관내 조건 및 생체내 조건에서 강력한 항암제로 작용함을 확인하였다(대한민국 특허출원번호: 제2003-10797호). 하지만, 많은 항암제들은 제제의 특성상 높은 농도의 단백질을 장기간 동안 지속적으로 환자에게 투여되어야 하기 때문에, 단백질의 생산과 생산된 단백질의 높은 단가 등 여러 가지 어려운 점을 예상할 수 있다. 또한, LK68 및 LK8 단백질은 자체의 물리적 성질로 인하여 세포외기질 (extracellular matrix)의 주성분인 여러 고분자 (fibrinogen, fibrin 등)와 결합할 수 있는 능력이 있으므로, 상기 단백질의 전신성 투여시에 단백질이 종양까지 도달하기 전에 비특이적 반응에 의해 손실될 수 있는 위험성이 크다.

<50>        이러한 단점을 극복할 수 있는 대체방안의 하나는 단백질을 직접 투여하는 대신 각 단백질을 코딩하는 유전자를 생체내 표적세포로 도입시킨 후 형질전환된 표적세포로부터 원하는 단백질이 직접 발현되어 작용할 수 있도록 하는 유전자 치료이다. 항암제인 상기 LK68 및 LK8 단백질 대신에 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 이용한

치료는 항암제로서의 효능을 극대화 할 수 있다. 이에 기초하여, 본 발명자들은 인간 아포리포단백질 (a) 의 많은 크링글 (kringle) 구조 중에서 KIV9-KIV10-KV (LK68) 구조를 포함하는 유전자 및 KV (LK8) 구조만을 지니는 유전자를 확보하고, 상기 유전자를 생체외 조건에서 암세포에 전달한 후 생체내로 주입하여 암세포의 성장과 전이를 관찰한 결과, 상기 유전자 전달에 의해 종양의 성장과 전이를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

<51> 본 발명자들은 LK68 또는 LK8 단백질을 코딩하는 유전자를 가진 재조합 레트로 바이러스 (retrovirus) 를 제조하고, 이를 이용하여 생체외 조건에서 결장암 세포에 전달한 후 이를 이용하여 생체 내에서의 종양의 성장과 전이에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한, LK68 또는 LK8 유전자를 포함하는 치료용 유전자 전달체인 아데노 부속 바이러스 (AAV) 를 제조하고, 이를 생체 내로 전달하여 종양의 성장억제 및 전이억제 효과를 확인함으로써, 상기 유전자가 항암용 치료제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

<52> 구체적으로 본 발명의 실시예에서, 본 발명자들은 아포리포단백질 (a) 의 말단부 3개의 크링글 (KIV9, KIV10, KV) 구조 (도 1 참조), 즉 LK68 단백질과 LK8 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 약 1 Kb 길이의 cDNA를 인간 간 (liver) cDNA 라이브러리 (library)로부터 중합효소연쇄반응 (RT-PCR) 을 통해 제조하였다. 상기 확보된 cDNA 의 적합성은 자동염기서열기를 통해 확인하고, 이를 LK68 유전자라 명명하였다. LK68 cDNA로부터 말단의 KV 크링글 부분만을 선택적인 프라이머를 통해 증폭하여 LK68과 같은 방법으로 클로닝하고, 이를 LK8 유전자라 명명하였다.

<53>        재조합 레트로바이러스의 제조를 위해서, 상기 제조된 유전자를 레트로바이러스 벡터 (retroviral vector)인 pLXSN (Clontech, USA)에 클로닝하였으며, LK68 유전자가 도입된 벡터는 pLXSN-LK68로, LK8 유전자가 도입된 벡터는 pLXSN-LK8로 각각 명명하였다 (도 1 참조). 다음에, 상기 재조합 벡터인 pLXSN-LK68과 pLXSN-LK8를 PT67 패키징 세포주 (packaging cell line)로 형질도입시켜 재조합 바이러스를 생산한 후, 표적 세포인 쥐 결장암 세포주 CT26에 LK68 또는 LK8 유전자를 전달하였다. LK68 유전자를 안정적으로 발현하는 CT26 세포주는 CT-LK68로, LK8 유전자를 발현하는 세포주는 CT-LK8로 명명하였다. 한편, 대조군인 LK68 및 LK8 유전자 없이 pLXSN 벡터만 도입된 세포주를 CT-vector라 명명하였다.

<54>        LK68 또는 LK8 유전자의 도입이 표적세포 자체의 성장 및 세포사멸에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다 (도 2 참조). 또한, 생체 내에서의 고형암의 성장 및 전이 억제를 통하여 CT-LK68 또는 CT-LK8 세포주로부터 발현된 LK68과 LK8 단백질의 항암 효능을 관찰하였다 (도 3 내지 도 7 참조). 그 결과, LK68 및 LK8 유전자를 이용한 유전자 치료제는 종양의 성장과 다른 장기로의 전이를 탁월하게 억제할 수 있음을 확인하였다.

<55>        또한, 상기 결과에 기초하여 본 발명자들은 상기 LK68 및 LK8 cDNA에 면역글로불린 카파 (kaapa,  $\kappa$ ) 사슬의 세포 밖 분비를 유도하는 신호염기서열과 FLAG 항원이 붙도록 cDNA를 구성하고, 상기 cDNA를 아데노 부속 바이러스 전달체 시스템에 도입하여 LK68 또는 LK8 유전자가 삽입된 재조합 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체를 제조하고, 이를 rAAV-LK68과 rAAV-LK8이라 명명하였다 (도 8 내지 도 10 참조). 상기 제조된 재조합 아데노 부속 바이러스에 의한 LK68 또는 LK8 유전자의 세포 혹은 조직

내로의 유전자 도입과 그로 인한 발현을 확인하였다(도 11 참조). 바이러스 전달체에 의해 전달되어 발현된 LK68 및 LK8 단백질은 동물실험을 통해서 전이성 암세포인 B16F10 흑색종(melanoma) 세포가 폐로 전이되는 것을 대략 30~60% 정도 저해한다는 것을 확인하였다(도 12 및 도 13 참조). 따라서, 재조합 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체인 rAAV-LK68과 rAAV-LK8은 항암용 유전자 치료제로 이용할 수 있음을 확인하였다.

<56> 또한, 본 발명은 상기 LK68 또는 LK8 유전자를 이용한 고형암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 이때, 상기 방법은 고형암의 성장 및 전이의 억제를 통하여 이루어지는 것이 바람직하다. 또한, 상기 유전자의 세포내 전달은 화학적 방법, 물리적 방법, 리포솜을 이용한 접합방법, 수용체를 이용한 방법 및 바이러스를 이용한 방법으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

<57> 아울러, 상기 치료방법은 조혈 줄기세포, 수지상 세포, 자가이식 종양세포 및 정착 종양세포로 구성된 군으로부터 선택된 세포에 유전자를 전달하고, 상기 세포를 인체에 투여하는 방법으로 이루어지는 것이 바람직하다.

<58> 본 발명자들은 LK68 또는 LK8 유전자의 도입이 생체 내에서의 고형암의 성장 및 전이 억제를 통하여 항암 효능을 확인하고 (

도 3 내지 도 7 참조), LK68 및 LK8 유전자를 이용한 유전자 치료제는 종양의 생장과 다른 장기로의 전이를 탁월하게 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한, 바이러스 전달체에 의해 전달되어 발현된 LK68 및 LK8 단백질은 전이성 암세포인 B16F10 흑색종 (melanoma) 세포가 폐로 전이되는 것을 대략 30~60% 정도 저해함을 확인하고 (도 12 및 도 13 참조), LK68 또는 LK8 유전자를 포함한 재조합 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체가 암전이를 억제함을 확인하였다.

<59> 유전자를 전달하는 방법에는 화학적, 물리적인 방법 외에도 리포솜을 이용하는 접합방법, 수용체를 이용하는 방법 및 바이러스를 이용하는 방법이 있다. 각 방법마다 장·단점이 있지만, 본 발명자들은 전달효율과 발현효율을 고려하여 바이러스 전달체를 이용한 전달방법을 선택하였다. 바이러스 전달체로는 여러 바이러스가 있지만 가장 널리 이용되는 것들로 아데노 바이러스 (adenovirus), 아데노 부속 바이러스 (adeno-associated virus) 와 레트로바이러스 (retrovirus) 등이 있다.

<60> 아데노 바이러스는 E1 유전자를 결손시키고, 그 부위에 전달하고자 하는 치료 유전자를 삽입하여 만드는 재조합 바이러스 시스템으로 이용되고 있다. 이 시스템을 사용하여 전체 유전자 치료용 벡터의 약 20% 정도가 시도되고 있다 (Journal of Gene Medicine Website, [www.wiley.co.uk/genemd/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genemd/clinical/)). 아데노 바이러스 유전자 전달체는 다양한 세포에 잘 감염될 뿐 아니라 숙주세포의 염색체 내로 삽입되지 않기 때문에 지속적인 발현 양상을 보기에는 어렵지만, 빠른 시일 내에 높은 발현을 유도하기에는 적합한 시스템이다.

<61> 아데노 부속 바이러스는 크게 ITR, Rep, Cap, ITR 순으로 구성되는 게놈을 갖고 있다. 아데노 부속 바이러스가 증식을 하기 위해서는 아데노 바이러스, 허피스 바



이러스와 같은 헬퍼 바이러스(helper virus)의 도움을 필요로 한다. 아데노 바이러스를 헬퍼 바이러스로 할 경우, 아데노 바이러스의 E1, E2a, E4, VA의 유전자를 필요로 하는데 이들 유전자와 자신의 Rep과 Cap 유전자가 포함된 헬퍼 플라스미드를 이용하여, Rep과 Cap이 빠진 부위에 치료용 유전자가 삽입된 재조합 아데노 부속 바이러스를 제조할 수 있다(Samulski, R.J. *et al.*, *J. Virol.*, **63**: 3822-3828, 1989). 아데노 부속 바이러스는 발현효율이 높을 뿐 아니라 유전자를 숙주세포의 염색체 19번의 아데노 S1이라는 특정 위치에 삽입하기 때문에 지속적인 발현효과를 나타낸다. 게다가, 자체적으로는 증식할 수 없는 바이러스이기 때문에 야생형 바이러스의 오염에 따른 안정성이 다른 여타 시스템보다 안전하고 바이러스로 인해 발생하는 부작용이 보고된 바 없다.

<62> 또한, 레트로바이러스는 현재 가장 널리 사용되고 있는 벡터 시스템으로 유전자 치료 임상시험에서 사용되고 있는 전체 유전자 치료용 벡터의 약 40% 정도를 차지하고 있다(Journal of Gene Medicine Website, [www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)). 아데노 부속 바이러스의 ITR과 비슷하게 양 말단의 LTR 사이에 치료용 유전자와 니오마이신이나 하이그로마이신, 퓨로마이신같은 항생제 저항 유전자를 삽입하여 재조합 바이러스를 제조한다(Miller, A.D. *et al.*, *Biotechniques*, **7**: 980-990, 1989). 레트로바이러스 시스템을 사용하면 숙주세포의 염색체로 유전자가 무작위적으로 삽입되어 지속적인 높은 발현효율을 기대할 수 있으나, 충분한 수의 바이러스를 제조하는 것이 어렵고, 비증식세포에 대한 감염효율이 낮다는 점등이 단점으로 지적되고 있다. 또한, 직접 체내에 주입하기보다는 간접적인 유전자 전달 방법을 흔히 이용한다. 즉, 재조합 바이러스를 직접 주사하는 것이 아니라 생체외 조건에서 배양된 세포에

먼저 감염시키고 유전자가 전달된 세포만을 선별하여 체내에 주입하는 방법이 널리 이용되고 있다. 그럼에도 불구하고, 생산세포 내에서 유사염기서열에 의한 상동 재조합에 의해 발생할 수 있는 RCR(증식 가능 레트로바이러스, replication competent retrovirus)에 의한 부작용 문제와 바이러스 생산 수율 및 감염 효율의 증대를 위한 연구가 선행돼야 하는 시스템이다.

<63>        본 발명자들은 상기 LK68 또는 LK8 유전자를 세포에 전달하기 위하여, 레트로바이러스 또는 아데노 부속 바이러스를 이용하였다.

<64>        구체적으로, 재조합 레트로바이러스의 제조를 위해서 LK68 또는 LK8 유전자를 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)인 pLXSN(Clontech)에 클로닝하여 LK68 유전자가 도입된 pLXSN-LK68 벡터와 LK8 유전자가 도입된 pLXSN-LK8 벡터를 제조하였다(도 1 참조). 다음에, 상기 벡터를 PT67 패키징 세포주로 형질도입시켜 재조합 바이러스를 생산한 후, 표적세포인 쥐 결장암 세포주 CT26에 LK68 또는 LK8 유전자를 전달하였다.

<65>        또한, 본 발명자들은 상기 LK68 및 LK8 cDNA에 면역글로불린  $\kappa$ 의 세포 밖 분비를 유도하는 신호염기서열과 FLAG 항원이 붙도록 cDNA를 구성하고, 상기 cDNA를 아데노 부속 바이러스 전달체 시스템에 도입하여 각각 LK68 또는 LK8 유전자가 삽입된 재조합 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체인 rAAV-LK68과 rAAV-LK8를 제조하고(도 8 내지 도 10 참조), 상기 제조된 재조합 아데노 부속 바이러스에 의한 LK68 및 LK8 유전자의 세포 혹은 조직 내로의 유전자 도입과 그로 인한 발현을 확인하였다(도 11 참조).

<66>        이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<67>        단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<68> <실시예 1> 재조합 단백질 LK68 또는 LK8을 발현하는 결장암 세포주의 확립

<69>        역전사 바이러스 (retrovirus)를 사용하여 LK68 또는 LK8 단백질을 코딩하는 유전자를 결장암 세포주에 도입하였다. 상기 유전자가 도입된 세포주 제조의 자세한 과정은 하기와 같다.

<70> <1-1> LK68 또는 LK8 단백질을 발현하는 재조합 벡터의 제조

<71>        우선, 서열번호 3으로 기재되는 LK68 유전자의 센스 프라이머 또는 서열번호 4로 기재되는 LK8 유전자의 센스 프라이머 및 서열번호 5로 기재되는 LK68 또는 LK8 유전자의 안티센스 프라이머를 이용한 PCR을, 94℃에서 5분 동안 반응시켜 DNA 이중사슬을 변성 (denaturation)시킨 뒤, 추가 변성을 위하여 94℃에서 30초, 결합 (annealing)을 위하여 56℃에서 30초, DNA 복제 (extension)를 위하여 72℃에서 1분의 과정을 30회 반복하고, 추가적으로 72℃에서 5분 동안 더 반응시키는 방법으로 각각 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재되는 사람 간(liver)의 LK68 단백질 또는 LK8 단백질을 코딩하는 cDNA 유전자 (이하, 'LK68 또는 LK8 유전자'로 약칭함)를 증폭하였다. 각각의 센스 프라이머에는 제한효소 *Sfi*I의, 안티센스 프라이머에는 제한효소 *Xho*I의

절단부위가 각각 삽입되어 있도록 제조하여 클로닝을 용이하게 하였다. 증폭된 PCR 산물의 발현으로 표적 단백질 (LK68 또는 LK8 단백질)이 세포 외부로 원활히 분비되는 것을 촉진하기 위하여, 앞서 사용한 제한효소인 *Sfi*I 및 *Xho*I 제한효소로 미리 절단한 pSecTag 벡터 (Invitrogen, USA)에 상기 PCR 산물을 연결 (ligation) 함으로써 Ig  $\kappa$  신호서열 (leader sequence)을 각 LK68 또는 LK8 유전자 상단 (upstream)에 위치하도록 pSecTag-LK68과 pSecTag-LK8 벡터를 제조하였다.

<72> 그 후, LK68 또는 LK8 유전자를 역전사 바이러스 벡터로 옮기기 위해서, 서열 번호 6으로 기재되는 센스 프라이머와 서열번호 5로 기재되는 안티센스 프라이머를 이용한 PCR을, 94℃에서 5분 동안 반응시켜 DNA 이중 사슬을 변성시킨 뒤, 추가 변성을 위하여 94℃에서 30초, 결합을 위하여 56℃에서 30초, DNA 복제를 위하여 72℃에서 1분의 과정을 30회 반복하고, 추가적으로 72℃에서 5분 동안 더 반응시키는 방법으로 상기 pSecTag-LK68과 pSecTag-LK8 벡터로부터 Ig  $\kappa$  -LK68과 Ig  $\kappa$  -LK8 DNA 부분만 선택적으로 증폭하였다. 이때, 각 프라이머에는 제한효소 *E. co*R1과 *Xho*I의 절단부위가 삽입되어 있도록 제조하여, 이후의 클로닝이 용이하도록 하였다. PCR로 증폭한 Ig  $\kappa$  -LK68과 Ig  $\kappa$  -LK8 DNA 절편을 상기의 제한효소 *E. co*R1과 *Xho*I으로 절단하고, 그에 앞서 동일한 제한효소로 절단한 역전사 바이러스 벡터인 pLXSN 벡터 (Clontech, USA)에 상기 DNA 절편을 클로닝하여 각각 pLXSN-LK68과 pLXSN-LK8 벡터를 제조하였다. 각 유전자의 염기서열 분석과 제한효소를 이용한 유전자 지도를 통하여 목적 유전자가 벡터에 완전하게 클로닝 되었는지의 여부를 확인하였다 (도 1의 A).

<73> <1-2> LK68 또는 LK8 유전자가 도입된 결장암 세포주의 제조

<74> LK68 또는 LK8 유전자를 포함하는 재조합 역전사 바이러스를 생산하기 위하여, 리포펙타민 (Lipofectamin)을 이용하여 **실시에 <1-1>**에서 제조한 pLXSN-LK68 또는 pLXSN-LK8 벡터로 패키징 세포주 (packaging cell line)인 PT67 (Clontech, USA)을 감염 (transfection)시켰다. 감염된 PT67 세포주로부터 만들어진 재조합 바이러스를 영하 80℃에 보관하고, 필요한 경우에 결장암 세포주인 CT26 (한국 세포주 은행)을 감염시키는데 사용하였다. 상기 바이러스로 감염된 CT26 세포주는 pLXSN 플라스미드에 존재하는 리포터 유전자로 인하여 G418 항생제 (농도: 1 mg/ml)에 저항성을 나타내므로, 이러한 항생제 내성을 이용하여 LK68 또는 LK8 단백질을 안정적으로 발현하는 세포주를 확보하였다. LK68 유전자가 도입된 세포주를 CT-LK68으로, LK8 유전자가 도입된 세포주를 CT-LK8로 각각 명명하였으며, 대조군으로 상기 단백질 (LK68 또는 LK8)을 코딩하는 유전자 없이 pLXSN 플라스미드만을 형질도입한 세포주를 CT-vector로, 바이러스 감염을 실시하지 않은 세포주를 CT-mock로 명명하였다.

<75> 상기 세포주 CT-LK68 및 CT-LK8로부터 LK68 및 LK8 단백질이 발현되는지를 웨스턴 블롯 (western blotting)과 RT (reverse transcriptase)-PCR을 통하여 확인하였다 (도 1의 B 및 C). 그 결과, 상기 세포주들이 각각 LK68 및 LK8 단백질을 발현하는 것을 확인하였다.

<76> **<실시에 2> 세포주 CT-LK68 및 CT-LK8의 실험실 조건에서의 증식 및 세포사멸 관찰**

<77> LK68 및 LK8 유전자 도입이 CT26 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 실험실 조건 (*in vitro*)에서 CT-LK68 및 CT-LK8 세포주의 증식과 사멸 (apoptosis)을 관찰하였다.

<78> 구체적으로, 세포주의 증식을 관찰하기 위해서, CT-LK68, CT-LK8, CT-vector 및 CT-mock 세포주를 24개 웰 (well)로 이루어진 조직배양 평판의 웰마다 각각  $2.5 \times 10^4$ 개의 세포를 분주하고, DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) /10% FBS (fetal bovine serum) 배지에서  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의 환경조건 하에서 배양하면서 시간별로 증식한 세포의 수를 트립판블루 배제 (trypan blue exclusion) 계수법 (Freshney, R.I., 1994, Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique, 3<sup>rd</sup> Ed. Wiley-Liss. New York, USA)을 사용해서 5일 동안 관찰하였다. 그 결과, LK68 및 LK8 유전자가 도입된 세포주와 대조군 간에 거의 동일한 증식양상을 관측할 수 있었다 (도 2의 A; 이때, X축은 관찰한 시간을 나타내며, Y축은 증식한 세포의 수를 나타낸 것이다).

<79> 세포사멸은 약  $1 \times 10^5$ 의 세포를 아넥신 (Annexin) V와 PI (propidium iodide, Clontech)로 염색한 후, FACS (fluorescence-activated cell sorter; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 통해 관찰하였다. 이때, 양성 대조군으로  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 택솔 (taxol)을 24시간 처리한 CT26 세포주를 사용하였다. 그 결과, 양성 대조군으로 사용된  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 택솔을 처리한 세포주의 사멸비율은 약 83%에 달하는 반면에, CT-mock 세포는 0.89%, CT-vector 세포는 1.21%, CT-LK68 세포는 0.96%로 나타났다 (도 2의 B). 상기 결과를 통하여, LK68 유전자의 발현은 CT26 세포주의 증식과 사멸에는 어떤 영향도 끼치지 않음을 확인하였다.

<80> <실시에 3> LK68 유전자의 도입으로 인한 고행암의 생장 억제

<81> 동종 이식된 종양 모델을 사용하여, LK68 유전자의 도입에 의하여 결장암 세포에서 발현된 LK68 단백질이 고행암의 생장 억제 효능이 있는지를 관찰하였다.

<82> 구체적으로, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 배양된 약  $5 \times 10^5$ 개의 CT-LK68 세포를 Balb/c 생쥐 (Charles River, Yokohama, Japan)의 등쪽 근위 중양부의 피하 접종하였다. 생쥐는 그룹 당 8 내지 10마리를 사용하였으며, 종양을 이식한 후 약 한 달 동안 암의 생장을 관찰하였다. 이때, CT-LK68 세포 대신에 CT-vector 또는 CT-mock 세포를 이식한 그룹을 대조군으로 설정하였다. 종양의 크기는 3 내지 4일에 한 번씩 측정하였으며, [길이  $\times$  나비<sup>2</sup>  $\times$  0.52] 식을 사용하여 암의 부피를 계산하였다.

<83> 그 결과, LK68 유전자가 도입된 CT-LK68 세포의 경우 종양의 생장이 대조군에 비해 현저히 저하되었다. 즉, 세포주를 이식한지 33일째에 관측한 결과, 대조군인 CT-vector와 CT-mock 세포의 성장률의 평균값과 비교 시, CT-LK68은 약 80% 정도의 생장 억제 효과가 관측되었다(도 3의 A). 관측 종료후 즉시 생쥐를 희생시키고 종양을 생쥐로부터 분리하여 무게를 측정하였는데, 부피의 결과와 동일하게 LK68 유전자가 도입된 CT-LK68 세포의 종양무게는 CT-vector 세포의 종양 무게에 비해 현저히 감소하였다(도 3의 B 및 C).

<84> <실시에 4> LK68 유전자의 도입으로 인한 비장에 이식된 결장암의 간 전이(liver metastasis) 억제

<85> 유전자 도입에 의하여 결장암 세포에서 발현된 LK68 단백질 또는 LK8 단백질이 고형암의 전이 억제효능이 있는지를 관찰하기 위하여, <실시예 3>에서 사용한 동종 Balb/c 생쥐의 비장에 결장암 세포가 주입된 간 전이 동물모델을 사용하여 암의 간 전이 (liver metastasis) 정도를 관측하였다.

<86> 구체적으로, 상기 Balb/c 생쥐의 비장에  $5 \times 10^4$ 개의 CT-LK68 세포를 이식하고, 이식한 후 14일째에 생쥐를 해부하여 간을 적출한 후 암의 관찰 및 전이된 암의 콜로니 (colony) 수를 계수하여 전이의 정도를 측정하였다. 도 4의 A는 결장암이 전이된 대표적인 간의 사진을 나타내는데, CT-vector 세포의 경우 간 표면 전체가 크고 작은 암들로 덮여 있는 비정상적인 간의 형태를 나타내었다. 반면에, CT-LK68과 CT-LK8 세포의 경우에는 암의 전이가 상당히 감소하였으며, 간의 형태도 정상적인 간과 상당히 유사하게 관찰되었다. 아울러, 간 표면에 전이되어 생긴 혹 (nodule)의 수를 측정해보면, LK68 유전자가 도입된 CT-LK68 세포는 단일면적당  $47 \pm 30$ 개 (표준편차), CT-LK8 세포는  $86 \pm 50$ 개 (표준편차)의 혹이 생성된데 반하여, 대조군인 CT-vector 세포는  $125 \pm 14$ 개 (표준편차)의 혹이 생성되었다. 따라서, LK68 또는 LK8 유전자가 도입된 세포주는 대조군에 비해 전이로 생성된 혹 수가 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다 (도 4의 B).

<87> 또한, 상기 간 표본을 포르말린으로 고정한 후, H&E (hematoxylin-eosin) 염색을 통하여 전반적인 결장암의 전이 양상을 관찰하고, 암세포의 증식은 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 염색을 통하여, 사멸은 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) 염색의 면역조직화학



적 방법을 통하여 분석하였다 (도 5의 A) (Junquera, Basic Histology, MIP). 일정한 영역 안에 있는 전체 세포수에 대하여 각각의 염색약에 양성으로 염색된 세포수의 비율을 백분율로 암세포의 증식지수와 사멸지수를 나타내었다.

<88> H&E 염색 결과, CT-LK68 세포를 이식한 숙주 생쥐의 간은 대조군인 CT-vector 세포를 이식한 동물에 비하여 전반적인 암 전이의 수가 감소하였을 뿐만 아니라 전이되어 형성된 혹의 크기 또한 현저히 작게 관찰되었다. 상기 결과를 통하여, LK68 유전자는 미세전이 암이 신혈관 형성을 통해 거대전이 (macrometastasis) 암으로 증식하는 과정 또한 억제함을 확인하였다.

<89> 다음으로 CT-LK68 세포와 대조군인 CT-vector 세포의 전체 세포에 대한 PCNA 염색된 세포의 비율은 각각  $64.5 \pm 3\%$  (표준편차) 와  $64.3 \pm 2\%$  (표준편차) 정도로 두 그룹간에 유사한 정도로 관찰되었다 (도 5의 B). 그러나, TUNEL 염색에서는 CT-LK68 세포 그룹은  $5.36 \pm 1.35\%$  (표준편차), CT-vector 세포 그룹은  $0.47 \pm 0.14\%$  (표준편차) 로 CT-LK68 세포 그룹의 암세포의 사멸정도가 현저히 증가한 것을 관찰하였다 (도 5의 C). 상기 결과로부터 유전자 도입으로 결장암 세포에서 발현된 LK68 단백질은 암세포의 증식에는 영향을 미치지 않으나, 암세포의 사멸에는 효과적으로 작용함을 확인하였다. 즉, LK68 유전자의 세포내 도입을 통하여, 결장암의 간으로의 전이 및 전이암의 생장을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

<90> 따라서, H&E, PCNA 및 TUNEL 염색 결과들을 모두 종합하여 판단할 때, LK68 유전자의 세포내 도입으로 인한 암 전이 억제 효능은 LK68 단백질 발현에 의한 암세포의 사멸로 인한 결과라고 판단된다.

<91> <실시예 5> 비장으로 이식된 결장암의 간 전이 (liver metastasis) 모델에서 LK68 유전자의 도입으로 인한 숙주의 생존률 증가

<92> <실시예 4>의 결장암의 간 전이 동물모델을 이용하여, LK68 유전자의 도입으로 인한 간 전이 억제가 생쥐의 생존률에 미치는 영향을 알아보았다.

<93> 구체적으로, 생쥐의 비장에  $4 \times 10^5$ 개의 CT-LK68 세포와 대조군인 CT-vector 세포를 주입한 후, 매일 생쥐의 상태와 생존여부를 관찰하였다. 대조군인 CT-vector 세포가 주입된 생쥐 그룹의 경우 실험을 시작한 후, 23일째부터 급속도로 사망하기 시작해서 상기 생쥐 그룹의 50%가 살아남은 생존기간은 24일, 전체적인 생존기간은 28일로 관찰되었고, CT-LK68 세포가 주입된 생쥐 그룹의 50%가 살아남은 생존기간은 36일, 전체적인 생존기간은 48일로 관찰되었다 (도 6). 카플란-메이어 (Kaplan-Meier) 생존곡선의 로그랭크 테스트 (log rank test)를 통하여, 두 그룹간의 생존률 차이의 통계적 유의성을 검정하였다. 이 실험 결과로부터, LK68 유전자의 세포내 도입은 결장암의 간 전이를 억제함으로써 숙주의 생존률을 현저히 증가시킴을 확인하였다.

<94> <실시예 6> 결장암의 복강전이 모델에서 LK68 유전자의 도입으로 인한 숙주의 생존률 증가

<95> 결장암은 간으로의 전이 이외에 복강을 통해서도 전이가 이루어지고, 상기 두 가지 형태의 전이가 결장암 환자의 수술 후 재발 및 사망의 주원인이다. 따라서,

LK68 유전자의 세포내 도입이 결장암의 복강전이 모델에서 숙주의 생존률을 증가시킬 수 있는지를 확인하였다.

<96> 구체적으로, <실시예 3>에서 사용한 동종 Balb/c 생쥐의 복강에  $4 \times 10^5$ 개의 CT-LK68 세포와 대조군인 CT-vector 세포를 주입한 후, 약 32일 동안 생쥐의 상태와 생존여부를 매일 관찰하였다. 대조군인 CT-vector 세포가 주입된 생쥐 그룹의 경우 실험이 시작한 후, 14일째부터 급속도로 사망하기 시작해서 상기 생쥐 그룹의 전체적인 생존기간은 21일로 관찰되었고, CT-LK68 세포가 주입된 생쥐 그룹의 50%가 살아남은 생존기간은 23일, 전체적인 생존기간은 28일로 관찰되었다(도 7). 카플란-메이어 생존곡선의 로그랭크 테스트를 통하여, 두 그룹간의 생존률 차이의 통계적 유의성을 검정하였다. 이 실험 결과로부터, LK68 유전자의 세포내 도입은 결장암의 복강전이를 억제함으로써 숙주의 생존률을 현저히 증가시킴을 확인하였다.

<97> <실시예 7> 재조합 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체 제조를 위한 전달 플라스미드 pAAV-LK68과 pAAV-LK8의 제조

<98> 본 발명자들은 LK68 및 LK8 cDNA를 재조합 아데노 부속 바이러스 벡터에 도입하여 각각 pAAV-LK68과 pAAV-LK8이라 명명하였다. pAAV-LK68과 pAAV-LK8 플라스미드 제조의 자세한 과정은 하기와 같다.

<99> <7-1> LK68 및 LK8 cDNA의 증폭

<100> 인간 간세포 cDNA 라이브러리 (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 주형 (template)으로 서열번호 7과 서열번호 8로 기재되는 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄반응을 통해 서열번호 1로 기재되는 LK68 cDNA를 상기 실시예 <1-1>과 동일한 PCR 수행 조건과 방법으로 증폭하였다. LK68 단백질이 세포 밖으로 분비되도록 하기 위하여, 상기 단백질의 아미노기 말단을 코딩하는 염기서열에 면역글로불린  $\kappa$ 의 신호염기서열을 연결시켜서 pcDNA3.1 (+) 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 클로닝하였다. 클로닝 후, ABI 자동염기서열기 (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용한 염기서열의 분석으로 LK68 cDNA가 제대로 삽입되었는지를 확인하고, 상기 벡터를 pcDNA-LK68이라 명명하였다. 또한, 상기 pcDNA-LK68을 주형으로 서열번호 8 및 서열번호 9로 기재되는 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여 LK8 cDNA를 증폭하고, LK68 cDNA와 동일한 방법으로 LK8 cDNA를 클로닝하고, 상기 방법으로 제조된 벡터를 pcDNA-LK8이라 명명하였다.

<101> pcDNA-LK68과 pcDNA-LK8을 주형으로 모두 서열번호 10 및 서열번호 11로 기재되는 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여 각각 LK68과 LK8 cDNA를 증폭하였다. 이때, 서열번호 10으로 기재되는 프라이머는 LK68 및 LK8 cDNA의 5' 말단에 연결된 면역글로불린  $\kappa$ 의 신호염기서열의 5' 말단과 결합하고 프라이머의 5' 말단에 *EcoRI* 제한효소 절단부위를 포함하도록 고안하였다. 서열번호 11로 기재되는 프라이머는 LK68 및 LK8 cDNA의 3' 말단에 FLAG 항원을 붙이도록 프라이머 내부에 FLAG를 코딩하는 염기서열을 갖도록 고안하였다. FLAG 항원 표지는 LK68 및 LK8 cDNA를 용이하게 분석하기 위한 것이다.

<102> 다음과 같이 PCR을 수행하였다. 주형으로 사용되는 pcDNA-LK68 또는 pcDNA-LK8 벡터 100 ng, 25 mM의 프라이머 각각 2  $\mu$ l, 10 $\times$  중합효소 연쇄반응 완충액 5  $\mu$ l, dNTP (각 2.5 mM) 혼합액 4  $\mu$ l, Ex-Taq 중합효소 2.5 U을 0.2  $\mu$ l PCR 튜브에 넣은 뒤, 3차 증류수로 최종 50  $\mu$ l가 되도록 조절하였다. 중합효소연쇄반응 조건은 DNA 가닥을 분리하기 위해 95 $^{\circ}$ C에서 5분을, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 52 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩 30회 반복하고, 추가적으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 더 반응시켰다. 중합효소 연쇄반응이 제대로 실행되었는지는 아가로스 겔 전기영동으로 확인하였다 (도 8).

<103> <7-2> 플라스미드 pAAV-LK68와 pAAV-LK8의 제조

<104> pAAV-hrGFP 벡터 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)의 GFP 유전자의 앞뒤에 있는 *Eco*RI과 *Xho*I 부위를 절단하여 GFP 유전자를 제거하고, 상기 부위에 LK68 또는 LK8 cDNA를 연결시켰다.

<105> 구체적으로, 중합효소연쇄반응을 통해 제조된 LK68과 LK8 cDNA를 *Eco*RI과 *Xho*I 제한효소로 각각 절단한 후, 겔 추출을 통해 절단된 DNA를 분리하고, T4 DNA 리가제 (ligase)로 16 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응시켜 대장균 (DH5  $\alpha$  : ATCC)을 형질전환시켰다 (도 9). 하루 후에 증식된 형질전환 대장균으로부터 DNA를 추출하여 GFP 유전자를 제거한 pAAV-hrGFP 벡터 (이하, 'pAAV'라 약칭함)에 LK68 및 LK8 cDNA가 제대로 삽입되었는지를 *Eco*RI과 *Xho*I으로 다시 절단해 봄으로써 확인하였다. LK68 cDNA가 pAAV 벡터에 제대로 삽입된 전달 플라스미드를 pAAV-LK68로, LK8 cDNA가 삽입된 전달 플라스미드를 pAAV-LK8이라 명명하였다 (도 10).

<106> <실시예 8> LK68 및 LK8 유전자를 전달하는 제조합 아데노 부속 바이러스의 생산 및 분리

<107> 본 발명자들은 아데노 부속 바이러스 LK68 및 LK8 유전자 전달체를 제조하기 위하여, pAAV-LK68 또는 pAAV-LK8 DNA를 아데노 바이러스의 E2a, E4, VA 유전자와 아데노 부속 바이러스의 Rep, Cap 유전자를 지니는 헬퍼플라스미드와 정량비율 1:5로 혼합하고, N/P 비율 5에 해당하는 양의 형질도입 시약 PEI (PolyPlus, Illkirch, France)와 상온에서 15분 동안 반응시킨 후, 아데노 바이러스의 E1 유전자가 삽입되어 안정하게 발현되는 HEK293 세포 (Microbix, Toronto, Ontario, Canada)에 한방울씩 천천히 떨어뜨린 뒤 48시간 동안 37°C에서 배양하였다. 상기 배양된 세포들을 수거하여 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 배지와 세포를 분리하고, 다시 0.15 M의 NaCl과 50 mM의 Tris-HCl (pH 8.5)로 구성된 완충액으로 상기 세포를 부유화 (resuspension)시킨 뒤, 급냉과 해동을 3번 반복하여 세포를 용해 (lysis)시켰다. 바이러스 외피 (capsid)로 포장되지 않은 DNA를 제거하기 위하여, 50 U/ml의 DNA 분해효소를 처리하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 뒤 3,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상청액 (supernatant)을 분리하였다. 상기 상청액으로부터 바이러스를 분리하기 위하여, 이오딕산놀 (iodixanol) 농도구배 초원심분리를 이용하였고 (Zolotukhin, S. *et al.*, *Gene Therapy*, 6: 973-985, 1999), 상기의 방법으로 생산 및 분리된 바이러스를 각각 rAAV-LK68과 rAAV-LK8이라 명명하였다.

<108> <실시에 9> 재조합 아데노 부속 바이러스에 의해 전달된 LK68 및 LK8 유전자의 발현

<109> <실시에 8>에서 제조한 전달 플라스미드 pAAV-LK68과 pAAV-LK8의 LK68 및 LK8 유전자가 정상적으로 발현되는지를 확인하기 위하여, 세포외 조건 (*in vitro*)에서 HEK 293 세포에 상기 플라스미드를 형질도입하여 LK68 및 LK8 유전자의 발현, 세포 외부로의 분비 및 생체외 뿐만 아니라 생체내에서의 발현 여부를 하기의 방식으로 확인하였다.

<110> <9-1> 실험실 조건 (*in vitro*)에서의 형질도입과 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체에 의한 LK68과 LK8 유전자의 발현

<111> 6-웰 플레이트에서 70~80% 정도로 배양되고 있는 HEK293 세포에 PEI (PolyPlus, Illkirch, France) 시약을 이용하여 pAAV-LK68 또는 pAAV-LK8 플라스미드 3 mg을 형질도입시킨 뒤, 24시간 동안 37℃에서 배양하였다.

<112> 한편, <실시에 8>에서 제조한 바이러스 유전자 전달체인 rAAV-LK68과 rAAV-LK8의 경우에는 혈장이 들어있지 않은 조건에서 각각의 6-웰 플레이트에서 70~80% 정도로 배양되고 있는 HEK293 세포에 상기 바이러스를 세포 수당 바이러스 중복 감염수 (multiplicity of infection)가 5가 되도록 감염시킨 뒤, 1시간 후에 배지를 교환해 주고 37℃에서 24시간 동안 추가 배양하였다.

<113> 상기 2 종류의 세포를 각각 수거한 뒤, 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포와 배지를 분리하고, 1×SDS-PAGE 시료 완충액 (50 mM의 Tris (pH 6.8), 2%의 SDS,

100 mM의 디티오프레이톨 (dithiothreitol), 0.1%의 브로모페놀블루 (bromophenol blue), 10%의 글리세롤 (glycerol))으로 상기 세포를 부유화시키고, 100℃에서 5분 정도 중탕 가열한 뒤, 10,000 rpm으로 2분 가량 원심분리하여 상청액을 분리하고, 배지는 원심분리형 농축장치 (Centricon YM-10; Amicon, Beverly, MA, USA)로 10배 농축하여 상기와 동일한 방법으로 시료화하였다.

<114> 전기영동 키트를 이용하여 15% SDS-PAGE에서 20 mA로 약 2시간 동안 전기영동하고, 트랜스퍼 유닛 (transfer unit)을 이용하여 300 mA로 트리스-글리신 (tris-glycine) 완충액 (39 mM의 글리신, 48 mM의 트리스, 0.037%의 SDS, 20%의 메탄올)에서 약 90분 동안 전기영동을 수행하여 PVDF 멤브레인 (polyvinylidene fluoride membrane)으로 전사 (transfer)시킨 뒤, 5%의 탈지분유/1×TBST 완충액 (10 mM의 트리스, 150 mM의 NaCl, 0.1%의 Tween-20)을 사용하여 상온에서 하룻밤 동안 블로킹 (blocking)하였다. 1차 항체로 생쥐 항FLAG 항원 단일클론항체 (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1:3,000으로 1×TBST 완충액에 희석하여 상온에서 1시간 정도 반응시킨 후에 상기 TBST 완충액으로 5분씩 6회 세척하였다. 2차 항체로 항생쥐 HRP (KPL, Gaithersburg, MD, USA)를 1:5,000으로 1×TBST 완충액에 희석하여 30분 동안 반응시킨 후, 상기 TBST 완충액으로 5분씩 6회 세척하고 발색반응액 (ECL; Amersham, Buckinghamshire HP7 9NA, UK)으로 LK68과 LK8 단백질 발현을 확인하였다 (도 11의 A: 형질 도입, 도 11의 B: 바이러스 전달체에 의한 유전자 전달).

<115> <9-2> Balb/c 누드 생쥐에서의 LK68 유전자의 발현



<116> 아포리포단백질 (a)는 생쥐에 없는 단백질이기 때문에, 본 발명자들이 개발한 LK68 유전자를 일반 생쥐에 도입시킨 경우에는 상기 생쥐가 LK68 단백질에 대한 항체 형성을 통한 체내 면역 반응에 의해 상기 단백질이 소멸될 것으로 판단하였다.

<117> 따라서, <실시에 8>에서 제조 및 분리한 아데노 부속 바이러스 유전자 전달체인 rAAV-LK68 및 rAAV-LK8을  $1 \times 10^9$  IU(infection unit, 감염 능력이 있는 바이러스를 나타내는 단위)의 양으로 상기 <실시에 3> 등에서 사용한 동종 Balb/c 누드 생쥐의 양 뒷다리 근육에 각각 세 곳에 나누어 주사하였다. 대략 3일 간격으로 안와정맥총(ocular venous plexus)을 시행하여 100  $\mu$ l의 혈액을 채취한 뒤, 단백질 분해효소 복합 저해제(protease inhibitor cocktail)를 처리하였다. 채취된 혈액은 1시간 가량 상온에 둔 뒤 12,000 rpm에서 10분 간 원심분리하여 혈구세포와 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장의 일부를 취해 효소면역측정법(ELISA)을 수행하여 혈액 내 LK68 또는 LK8 유전자의 발현량을 정량적으로 측정하고, 또한 상기 실시예 <9-1>에서 수행한 웨스턴 블롯(western blot) 분석으로 직접 단백질 발현을 확인하였다. 효소면역측정법은 LK68 단백질이 갖는 3개의 크링글(kringle) 중에서 카르복실산(carboxylic acid) 말단 크링글(LK8 단백질)에 대한 2개의 혈청형이 다른 항체를 이용하였다. 하나는 토끼 항LK8 항체이고 다른 하나는 생쥐 항LK8 항체이다. 면역글로블린(immunoglobulin)이 잘 결합하도록 제조된 플레이트(F8 MAXISORP LOOSE; Nunc, Roskilde, Denmark)에 토끼 항LK8 항체를 구획 당 0.25 mg을 코팅 완충액(10 mM의 PBS, pH 7.2)과 혼합하고, 37°C에서 1시간 동안 놓아둔 뒤, 세척액(1×PBS, 0.1%의 Tween 20)으로 3회 세척하였다. 1% BSA의 단백질이 첨가된 세척액 200  $\mu$ l를 첨가하고, 다시 상온에서 2시간 동안 블로킹을 하였다. 상기에서 준비한 혈장을 여러 비율

로 희석하여, 37℃에서 한 시간 동안 반응시킨 뒤, 세척액으로 3회 세척하고 1:1,000으로 희석된 쥐 항LK8 항체를 37℃에서 한 시간 동안 처리하였다. 최종적으로 항생 쥐 HRP (KPL, Gaithersburg, MD, USA)를 1:20,000으로 희석하여 처리한 뒤에 세척액으로 3회 세척하고, TMB 효소기질 (KPL, Gaithersburg, MD, USA)을 처리하여 발색된 정도를 450 nm 파장으로 설정된 광측정기 (photometer)로 측정하여 정량화된 LK68 단백질 비교군과 비교하여 그 양을 측정하였다. LK8 유전자의 혈액내 발현량을 측정하기 위해서는 정량화된 LK8 단백질을 비교군을 사용하였다.

<118> 그 결과, 바이러스 전달체에 의해 전달된 LK68 유전자는 서서히 발현량이 증가하여 2주 후에 150~200 ng/㎖의 수치를 보였고, LK8 유전자는 서서히 발현량이 증가하는 양상은 LK68과 동일하나, 그 양이 20~30 ng/㎖로 LK68 유전자 보다는 낮은 수치를 나타내었다 (도 12의 A, B 및 C).

<119> <9-3> 유체 역학적 주입에 의한 LK68과 LK8 유전자의 발현

<120> 25 mg의 LK68 또는 LK8 유전자를 포함한 플라스미드가 용해되어 있는 1.8 ㎖의 0.25% 식염수를 C57BL/6 정상 생쥐 (Charles River, Yokohama, Japan)의 꼬리정맥에 7초 이내에 주입하였다. 주입한지 하루 후에 안와정맥총을 통해 채혈하여 혈액내 LK68 및 LK8 유전자의 발현량을 측정하였다. 그 결과, LK68 단백질은 20~25 mg/㎖, LK8 단백질의 경우는 200~250 ng/㎖ 정도의 발현을 확인하였다 (

도 12의 D). 상기 수치는 아데노 부속 바이러스 전달체에 의한 것과 비교하여 LK68 유전자는 100배, LK8 유전자는 10배 정도 높은 발현량으로, 상기 유체 역학적 주입은 다량의 DNA를 수 초내에 주입함으로써 짧은 시간 내에 체내에서 높은 유전자의 발현을 유도하기 때문에 바이러스 전달체에 비해 높은 발현 수치를 나타낼 수 있다 (Liu, F. et al., *Gene Therapy* 6: 1258-1266, 1999).

<121> <실시예 10> LK68 및 LK8 유전자 도입에 의한 전이성 암의 생장 억제

<122> 본 발명자들은 LK68 또는 LK8 유전자의 발현 단백질이 생체내 조건 (*in vivo*)에서 전이성 암의 전이 및 생장을 억제한다는 것을 하기에서 확인하였다.

<123> 구체적으로, <실시예 8>에서 제조 및 분리한 아데노 부속 바이러스 LK68 유전자 전달체 (rAAV-LK68) 또는 LK8 유전자 전달체 (rAAV-LK8)를  $1 \times 10^9$  IU의 양으로 상기 <실시예 3> 등에서 사용한 동종의 Balb/c 누드 생쥐의 양 뒷다리 근육에 각각 세 곳에 나누어 주사한 뒤, 3일 마다 안와정맥총을 수행하여 혈액 내의 LK68 또는 LK8 유전자의 발현량을 확인하였다.

<124> 처음 재조합 아데노 부속 바이러스 LK68 또는 LK8 유전자 전달체를 주사한지 2 주 후에  $2 \times 10^5$ 개의 B16F10 흑색종 (melanoma) 세포 (ATCC, Manassas, VA, USA)를 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. B16F10 흑색종 세포는 주로 폐로 전이되는 세포주로서 보통 주입한 지 2주가 지나면 폐 표면에 작고 검은 돌기모양의 암세포가 나타난다 (Fidler, I.J.

*et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**; 1199-1202, 1976). B16F10 멜라노마 세포를 주입한지 2주 후에 생쥐의 폐를 추출하여 표면의 검은 암세포 돌기의 개수를 측정하였다. 그 결과 30~60% 가량의 암 전이 억제 효과가 있음을 확인하였다 (도 13).

#### 【발명의 효과】

<125> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명자들은 생체 밖의 환경에서 유전자 조작 방법으로 LK68 및 LK8 유전자가 도입된 재조합 결장암 세포주 (CT-LK68 및 CT-LK8)를 제조하고, 상기 세포주에 도입된 LK68 및 LK8 유전자가 생체내 조건에서 종양의 생장 및 전이를 효과적으로 억제함을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 LK68 및 LK8 유전자는 전이성 암의 생장을 억제하며, 바이러스 전달체를 이용해 보다 효율적으로 체내로 전달할 수 있어 다양한 암 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

인간 아포리포단백질 (a) 크링글 (kringle) KIV9-KIV10-KV (LK68) 또는 KV (LK8) 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 전이억제용 유전자 치료제.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 LK68 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 치료제.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 치료제는 유효성분으로 LK68 유전자를 포함하고 인체 또는 동물세포에서 발현되는 레트로바이러스 벡터, 아데노 바이러스 벡터, 아데노 부속 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 플라스미드, 조혈 줄기세포, 수지상 세포, 자가이식 종양세포 (autologous tumor cells) 및 정착 종양세포 (established tumor cells)로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 치료제.

**【청구항 4】**

제 3항에 있어서, 상기 벡터 또는 바이러스는 pSecTag-LK68, pLXSN-LK68, rAAV-LK68 및 pAAV-LK68로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 치료제.

**【청구항 5】**

제 1항에 있어서, 상기 LK8 유전자는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 치료제.

**【청구항 6】**

제 5항에 있어서, 상기 치료제는 유효성분으로 LK8 유전자를 포함하고 인체 또는 동물세포에서 발현되는 레트로바이러스 벡터, 아데노 바이러스 벡터, 아데노 부속 바이러스 (AAV) 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 플라스미드, 조혈 줄기세포, 수지상 세포, 자가이식 종양세포 및 정착 종양세포로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 치료제.

**【청구항 7】**

제 6항에 있어서, 상기 벡터 또는 바이러스는 pSecTag-LK8, pLXSN-LK8, rAAV-LK8 및 pAAV-LK8로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 치료제.

【청구항 8】

제 1항에 있어서, 상기 치료제는 체중 1 kg당 플라스미드 또는 벡터의 경우에는 0.05 ~ 12.5 mg/kg, 바이러스의 경우에는  $10^7 \sim 10^{11}$  바이러스 입자 ( $10^5 \sim 10^9$  IU)/kg, 세포의 경우에는  $10^3 \sim 10^6$  세포/kg로 투여되는 것을 특징으로 하는 치료제.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 치료제는 체중 1 kg당 플라스미드 또는 벡터의 경우에는 0.1 ~ 10 mg/kg, 바이러스의 경우에는  $10^8 \sim 10^{10}$  바이러스 입자 ( $10^6 \sim 10^8$  IU)/kg, 세포의 경우에는  $10^2 \sim 10^5$  세포/kg로 투여되는 것을 특징으로 하는 치료제.

【청구항 10】

제 1항에 있어서, 상기 치료제는 플라스미드 또는 벡터의 경우에는 정맥주사로 1회 또는 2~10회 반복투여, 바이러스의 경우에는 근육주사, 정맥주사, 피하주사 및 간문맥내 주사로 구성된 군으로부터 선택된 투여로 1회 또는 2~10회 반복투여, 세포의 경우에는 정맥 주사로 1회 또는 2~10회 반복 투여하는 것을 특징으로 하는 치료제.

【청구항 11】

제 1항에 있어서, 상기 치료제는 결장암, 간암, 폐암, 유방암, 뇌종양, 전립선암, 피부암, 위암, 췌장암, 신장암 및 난소암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을

치료하는 것을 특징으로 하는 치료제.

【청구항 12】

제 1항의 인간 아포리포단백질 (a) 크링글 (kringle) KIV9-KIV10-K V (LK68) 또는 K V (LK8) 유전자를 이용한 고형암 예방 또는 치료방법.

【청구항 13】

제 12항에 있어서, 상기 방법은 고형암의 생장 및 전이의 억제를 통하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료방법.

【청구항 14】

제 12항에 있어서, 상기 유전자의 세포내 전달은 화학적 방법, 물리적 방법, 리포솜을 이용한 접합방법, 수용체를 이용한 방법 및 바이러스를 이용한 방법으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료방법.

【청구항 15】

제 12항에 있어서, 상기 치료방법은 조혈 줄기세포, 수지상 세포, 자가이식 종양세포 및 정착 종양세포로 구성된 군으로부터 선택된 세포에 유전자를 전달하고, 상기 세포를 인체에 투여하는 방법으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료방법.

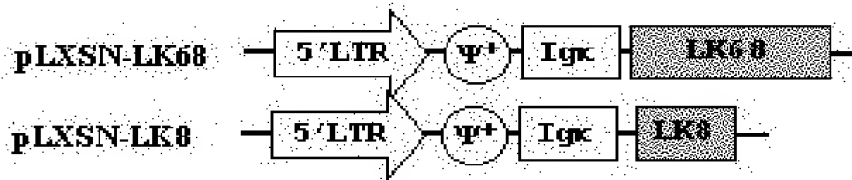


【도면】

【도 1】

(a)

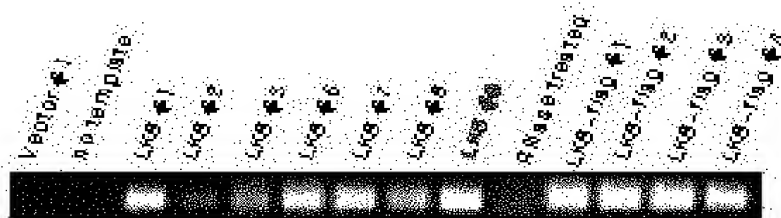
아포리포단백질(a)



(b)

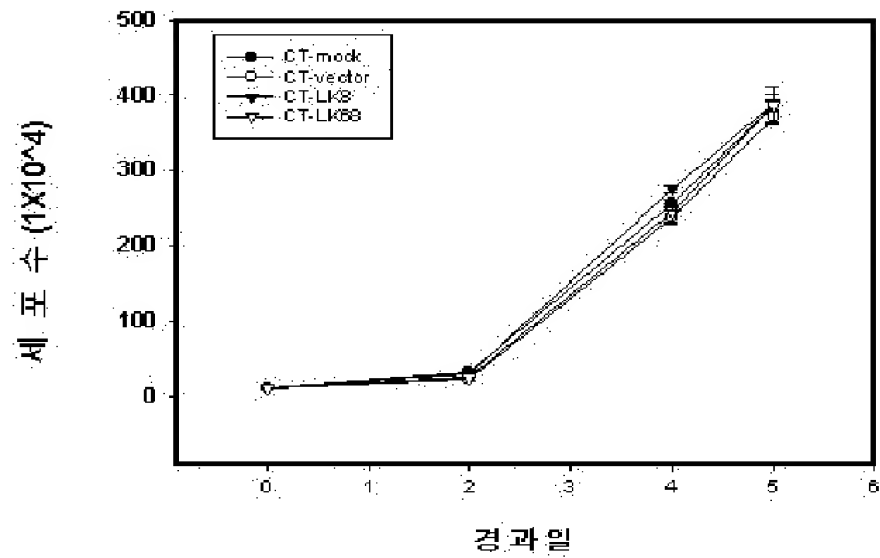


(c)

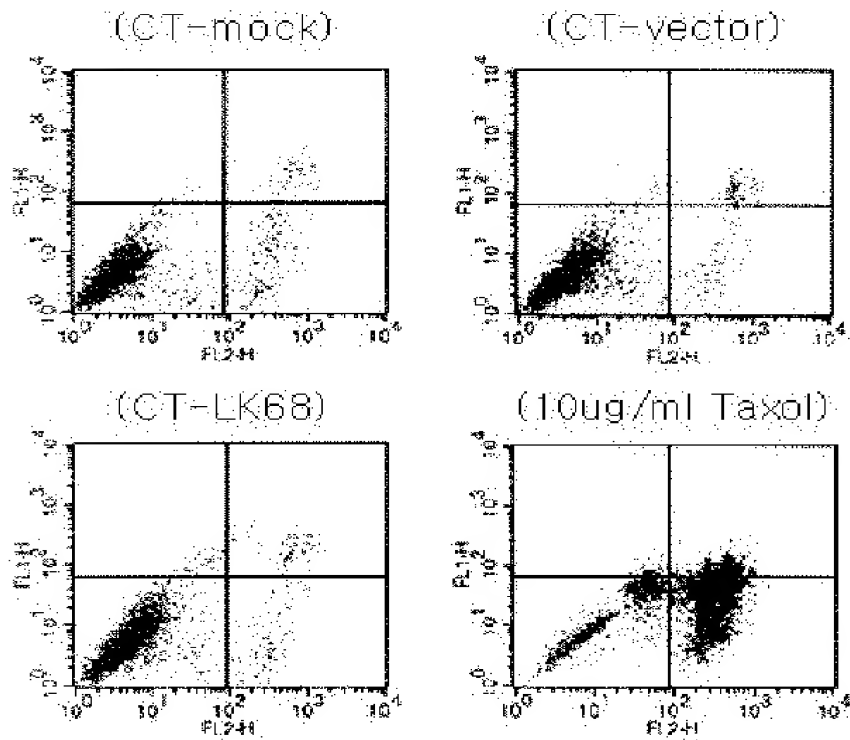


【도 2】

(a)

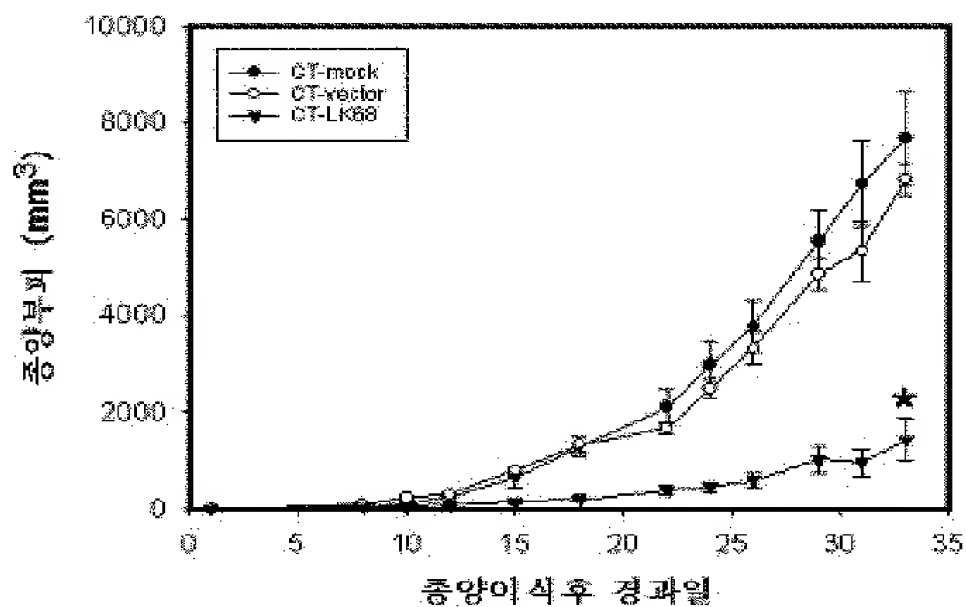


(b)

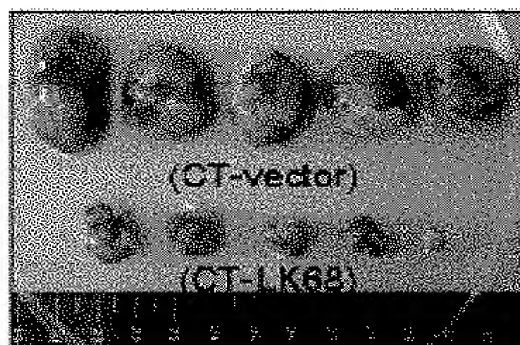


【도 3】

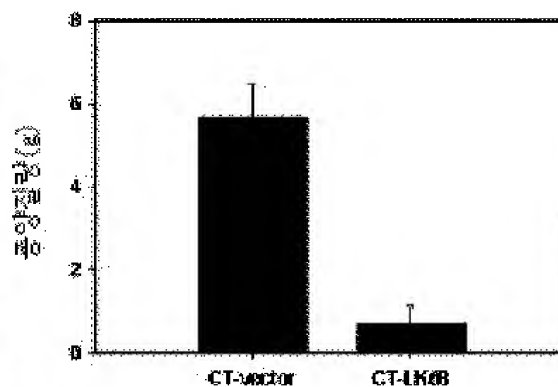
(a)



(b)



(c)



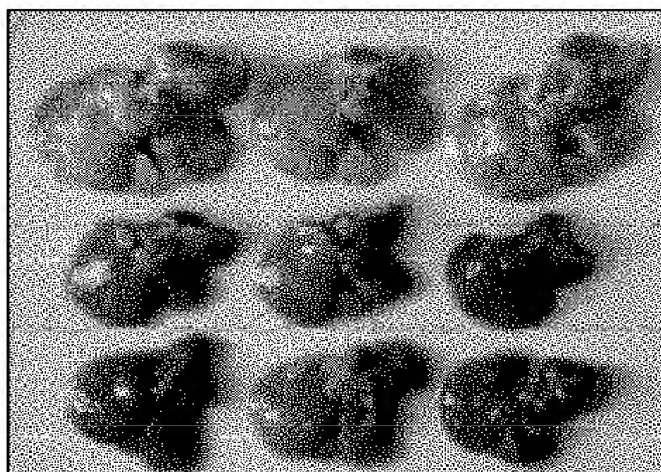
【도 4】

(a)

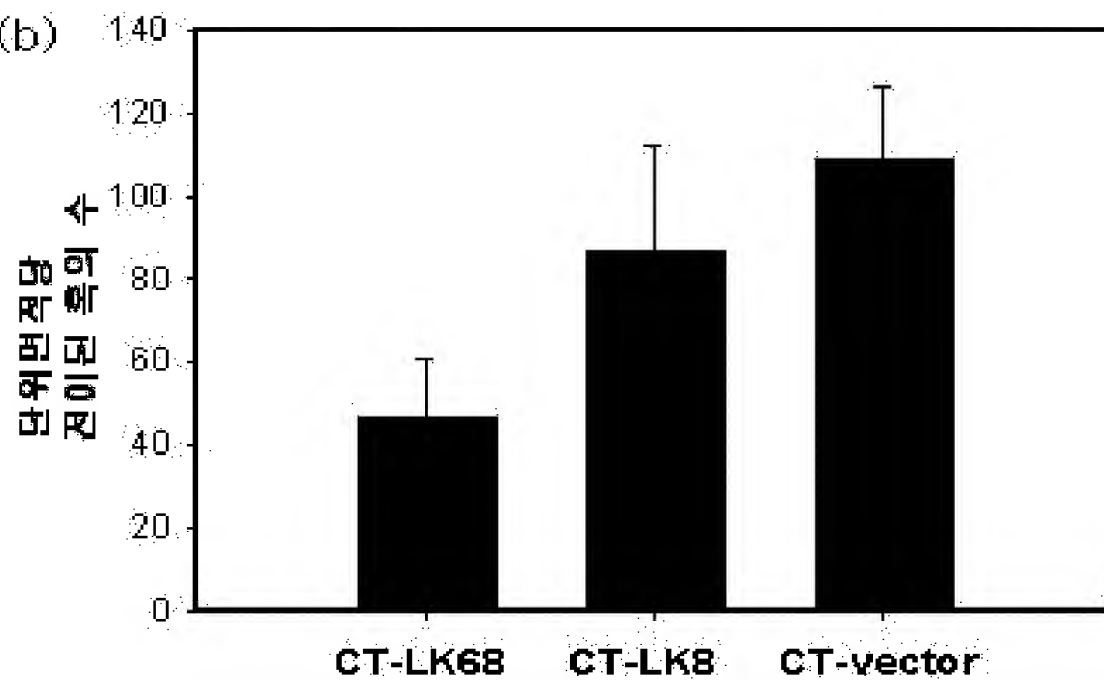
CT-vector

CT-LK68

CT-LK8

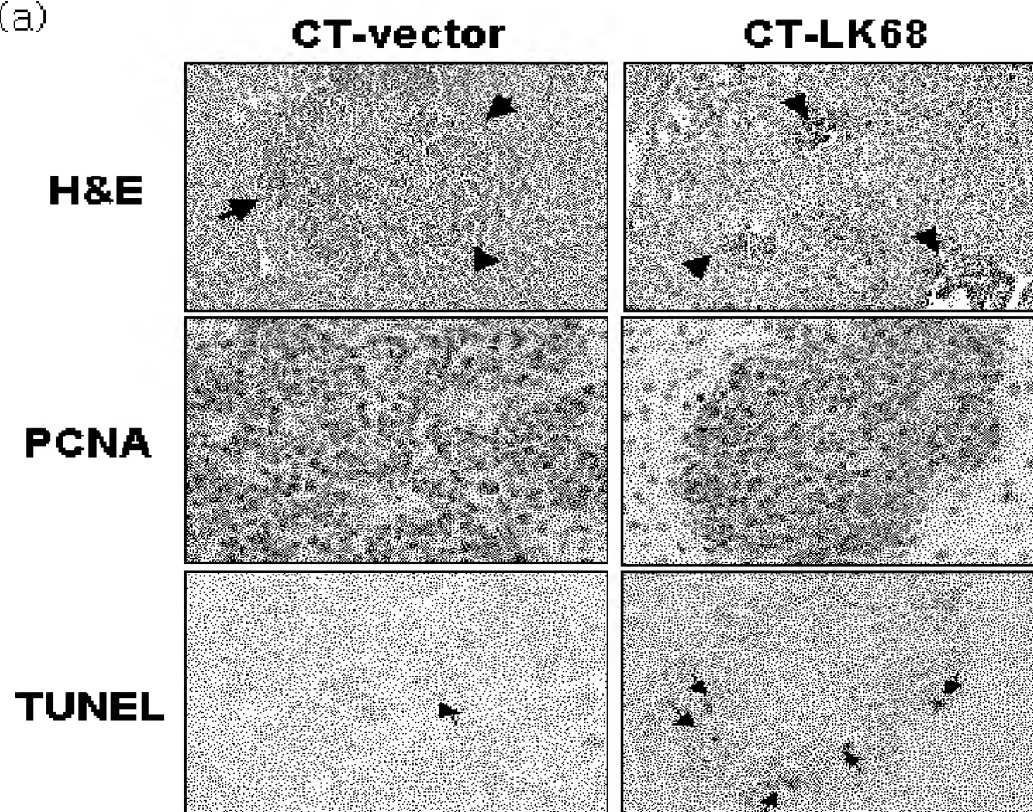


(b)

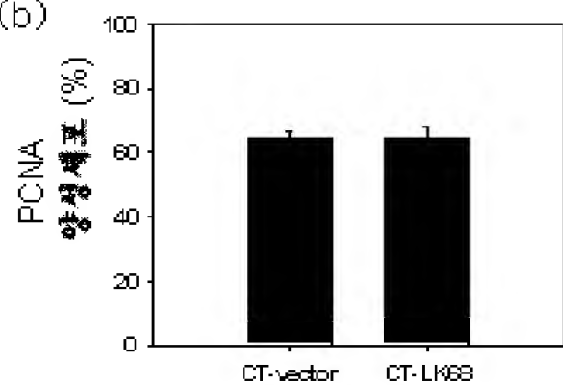


【도 5】

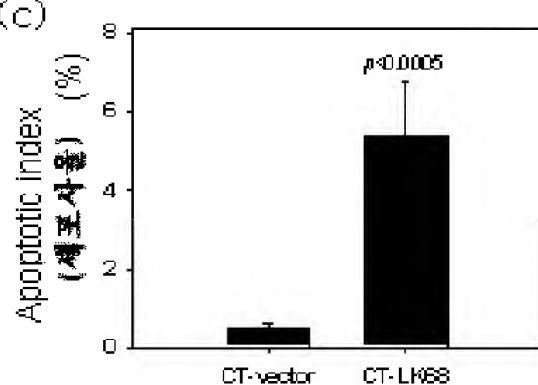
(a)



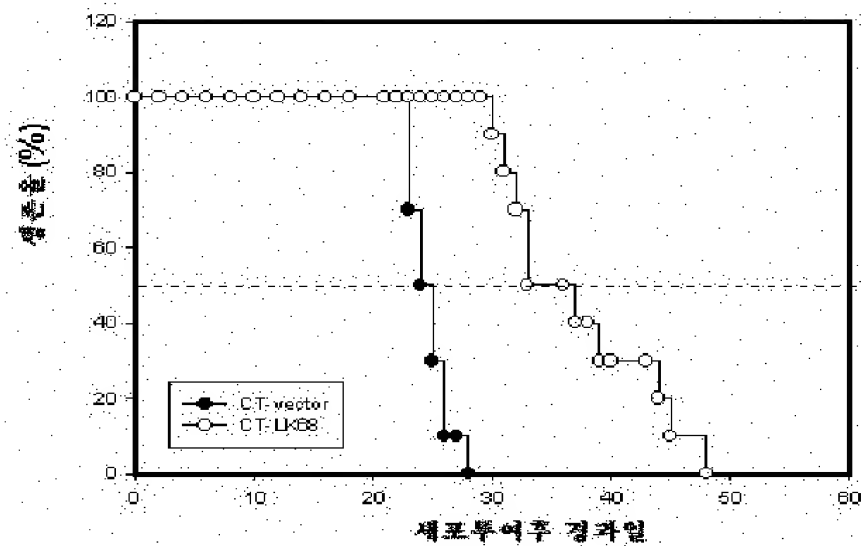
(b)



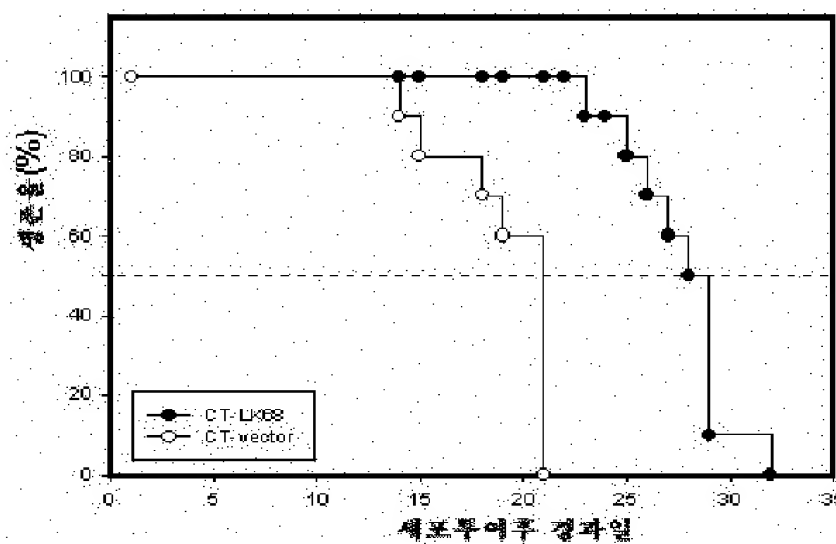
(c)



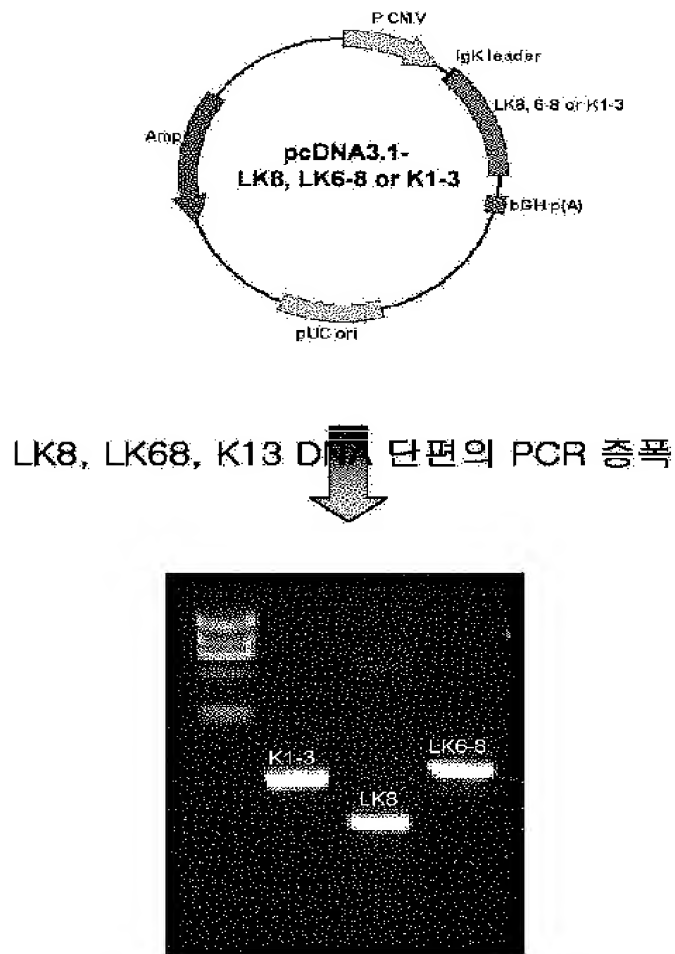
【도 6】



【도 7】



【도 8】



*EcoRI*

IgK F : 5'-ggA ATT CAA gCT ggC Tag CCA-3'

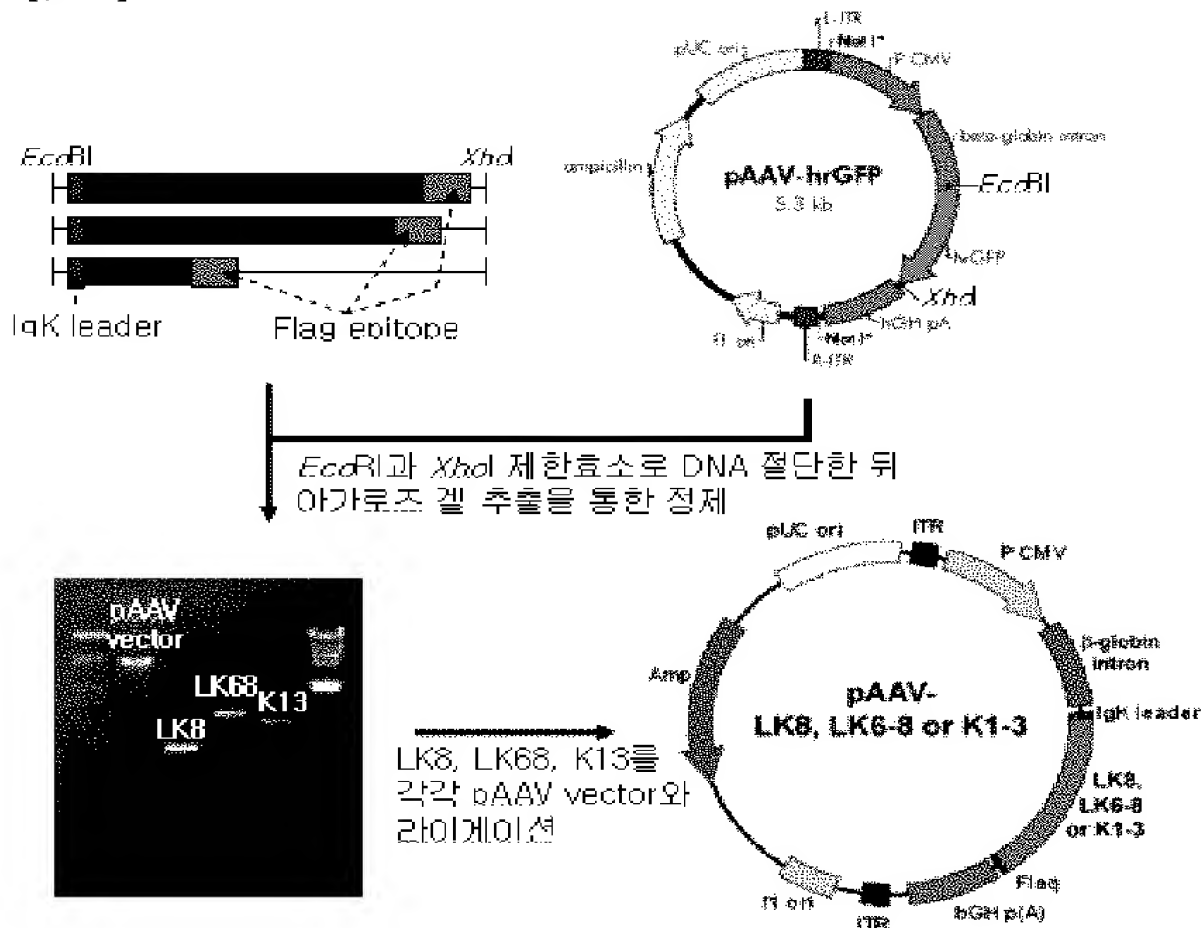
LK8 R : 3'-gA gAC ACg TAg gAg ACT gAT gTT CCT gCT gCT ACT gTT CAT TgA gCT CTA-5'

K1-3 R : 3'-g CAg gAC ACT gAg gCT gAT gTT CCT gCT gCT ACT gTT CAT TgA gCT CTA-5'

Flag 에피토프

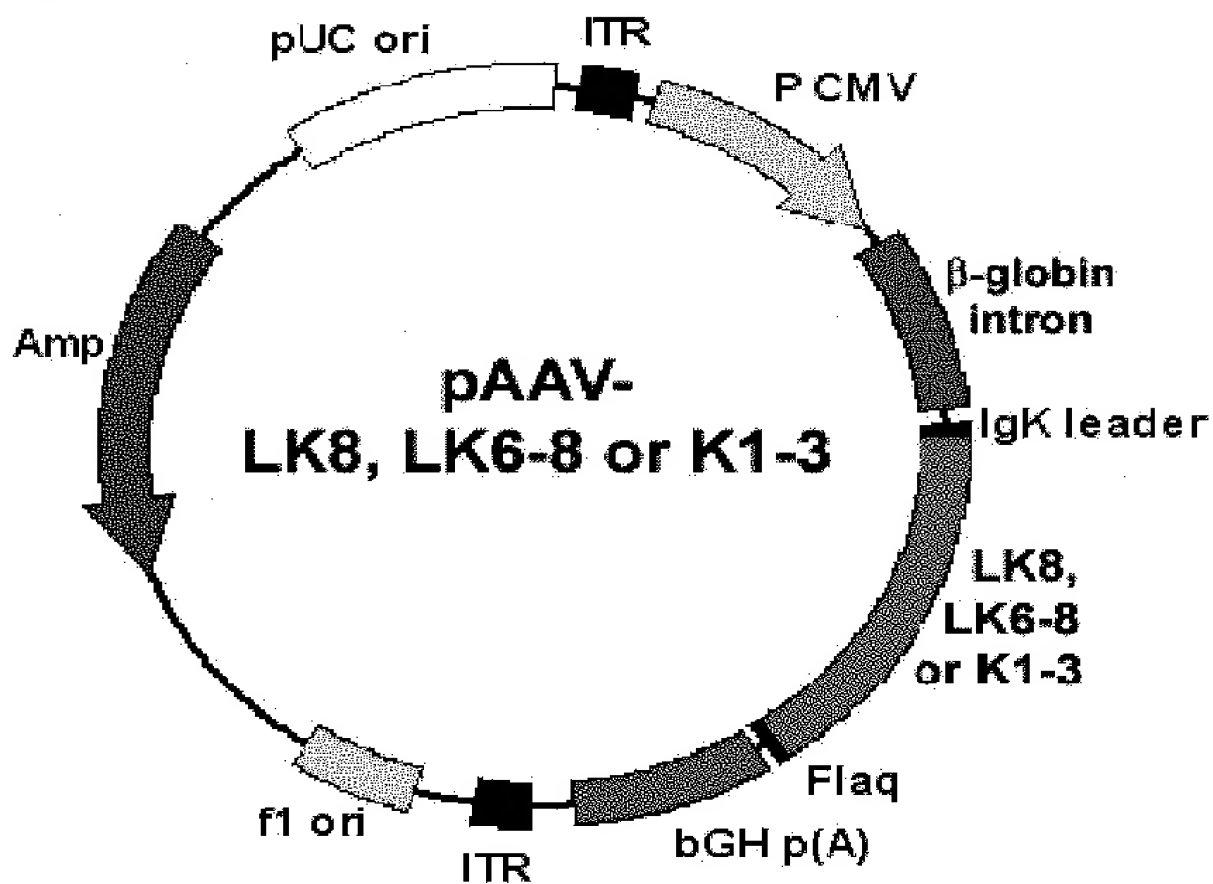
*XhoI*

【도 9】



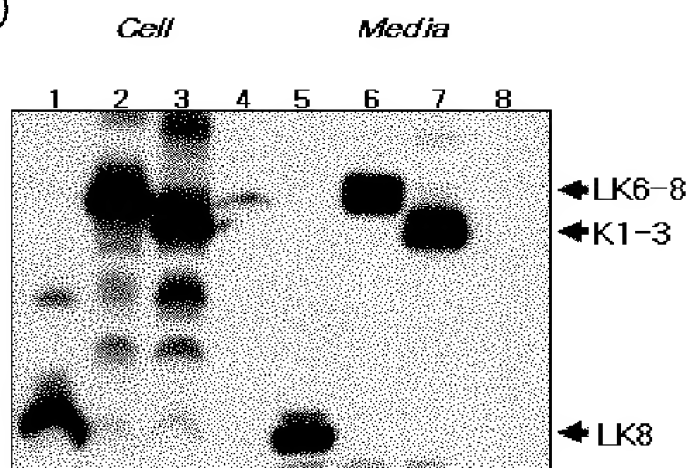


【도 10】



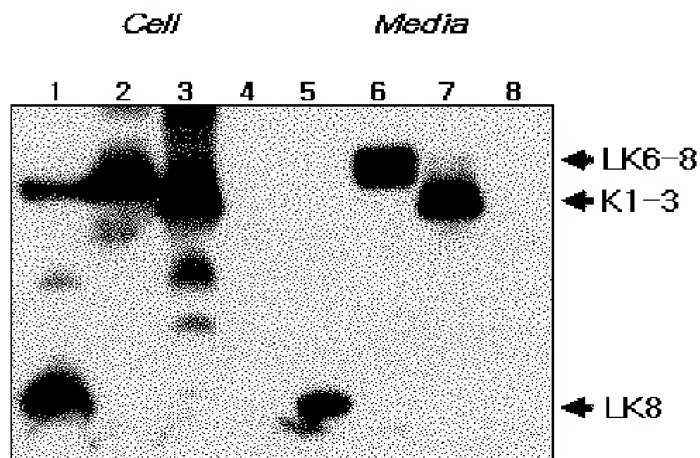
【도 11】

(a)



Lane 1 and 5: pAAV-LK8 transfected  
 Lane 2 and 6: pAAV-LK6-8 transfected  
 Lane 3 and 7: pAAV-K1-3 transfected  
 Lane 4 and 8: pAAV-lacZ transfected

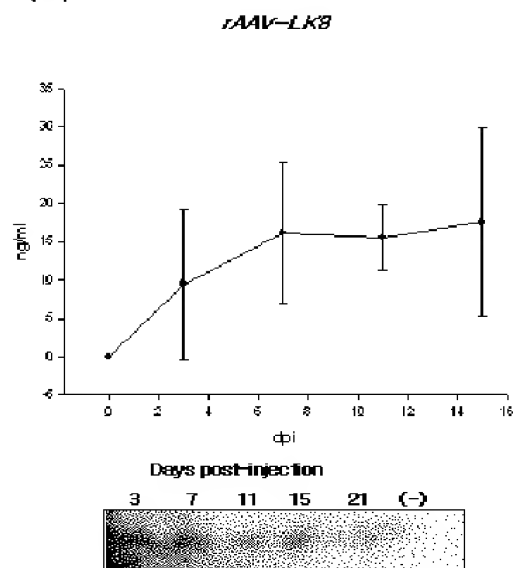
(b)



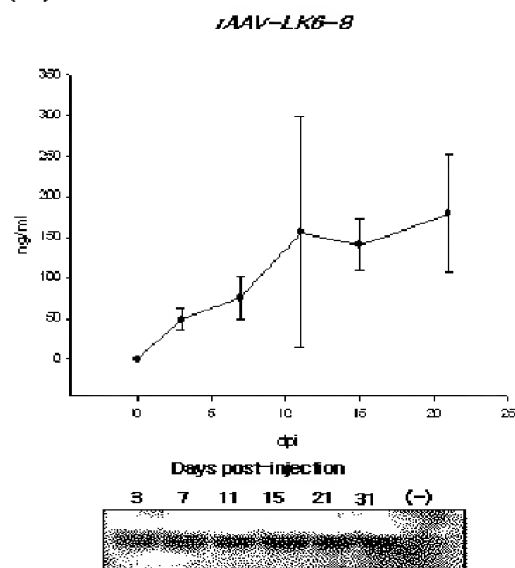
Lane 1 and 5: rAAV-LK8 infected  
 Lane 2 and 6: rAAV-LK6-8 infected  
 Lane 3 and 7: rAAV-K1-3 infected  
 Lane 4 and 8: rAAV-LacZ infected

【도 12】

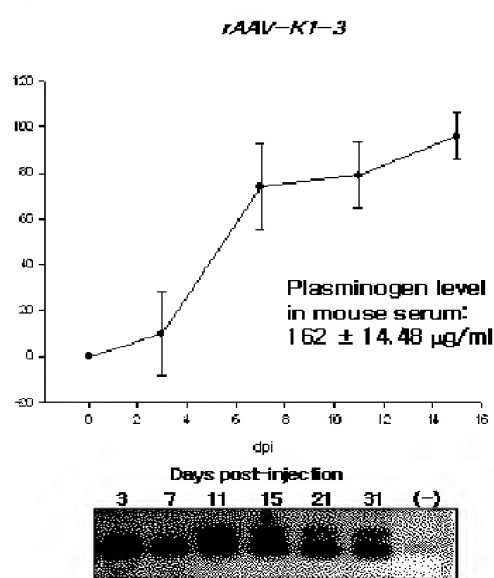
(a)



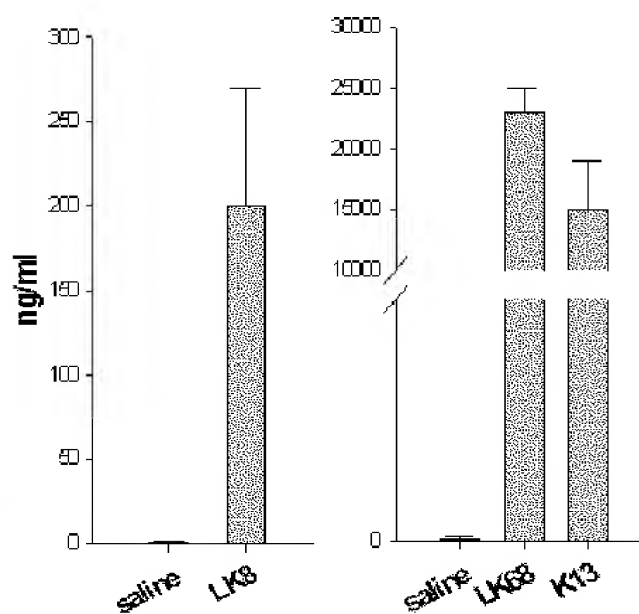
(b)



(c)



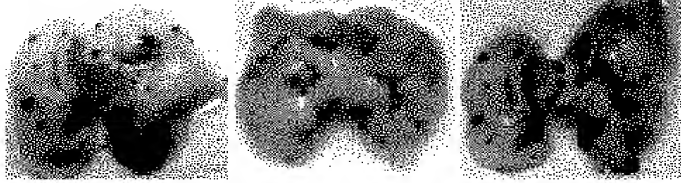
(d)



【도 13】

(a)

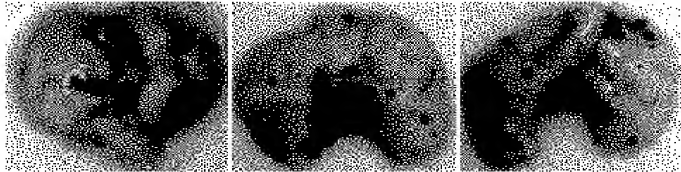
*pAAV-LK8*



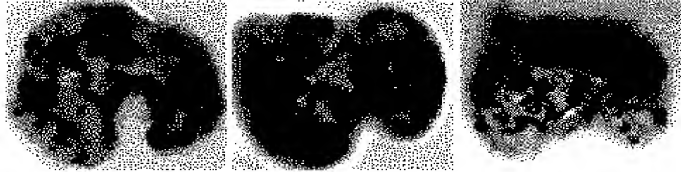
*pAAV-LK6-8*



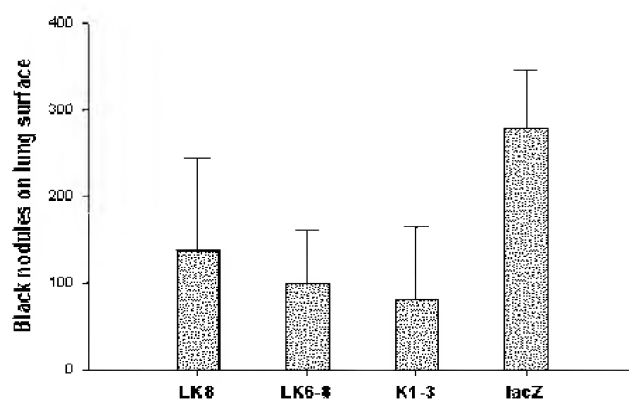
*pAAV-K1-3*



*pAAV-lacZ* (number of black nodules on lung surface : mean 279)



(b)



【서열목록】

<110> MOGAM BIOTECHNOLOGY INSTITUTE <120> Gene-therapeutic agent for anticancer comprising human apolipoprotein(a) kringles LK68 or LK8 genes as effective ingredient, and therapeutic method of cancer using the genes <130> Op-08-24 <160> 11 <170>

KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 924 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 1 aaaagccctg  
 tggccagga ttgctaccat ggtgatggac ggagttatcg aggcatatcc 60 tccaccactg tcacaggaag  
 gacctgtcaa tcttgggtcat ctatgatacc aacttggcat 120 cagaggaccc cagaaaaacta cccaaatgct  
 ggccctgaccg agaactactg caggaatcca 180 gattctggga aacaaccctg gtgttacaca accgatccgt  
 gtgtgagggtg ggagtactgc 240 aatctgacac aatgctcaga aacagaatca ggtgtcctag agactccac  
 tgttgttcca 300 gttccaagca tggaggctca ttctgaagca gcaccaactg agcaaaccoc tgtggtccgc  
 360 cagtgtctacc atggcaatgg ccagagttat cgaggcacat tctccaccac tgtcacagga 420 aggacatgtc  
 aatcttggtc atccatgaca ccacaccggc atcagaggac cccagaaaac 480 tacccaaagt atggcctgac  
 aatgaactac tgcaggaatc cagatgccga tacaggccct 540 tgggtgttta ccacggaccc cagcatcagg  
 tgggagtact gcaacctgac gcgatgtca 600 gacacagaag ggactgtggt cgctcctccg actgtcatcc  
 aggttccaag cctagggcct 660 ccttctgaac aagactgtat gtttgggaat gggaaaggat accggggcaa  
 gaaggcaacc 720 actgttactg ggacgccatg ccaggaatgg gctgcccagg agccccatag acacagcacg  
 780 ttcattccag ggacaaataa atgggcaggt ctggaaaaaa attactgccg taaccctgat 840 ggtgacatca  
 atggtccctg gtgctacaca atgaatccaa gaaaactttt tgactactgt 900 gatatccctc tctgtgcatc ctct  
 924 <210> 2 <211> 258 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 2 gaacaggact gcatgtttgg  
 gaatgggaaa ggataccggg gcaagaaggc aaccactgtt 60 actgggacgc catgccagga atgggctgcc  
 caggagcccc atagacacag cacgttcatt 120 ccagggacaa ataaatgggc aggtctggaa aaaaattact  
 gccgtaacc tgatggtgac 180 atcaatggtc cctggtgcta cacaatgaat ccaagaaaac ttttgacta  
 ctgtgatata 240 cctctctgtg catcctct  
 258 <210> 3 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> sense primer  
 of LK68 <400> 3 gcggcccagc cggccaaaag cctgtggtc caggattgc 39  
 <210> 4 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> sense primer of  
 LK8 <400> 4 gcggcccagc cggccctcc ttctgaacaa gac 33  
 <210> 5 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense primer  
 of LK68 or LK8 <400> 5 ccgctcgagt taagaggatg cacagagagg gatata

36 <210> 6 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> sense primer  
for virus vector <400> 6 ccggaattcc tagccaccat ggagacagac acactcctg

39 <210> 7 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> LK68 NdeI  
sense primer <400> 7 tccatatgaa aagccctgtg gtccaggat

29 <210> 8 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> LK68 BamHI  
antisense primer <400> 8 cgggatcctt aagaggatgc aca

23 <210> 9 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> LK8 NdeI  
sense primer <400> 9 catatgtctg aacaagactg tatg

24 <210> 10 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> IgK EcoRI  
forward primer <400> 10 ggaattcaag ctggctagcc a

21 <210> 11 <211> 50 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> LK68 Flag  
epitope, XhoI antisense primer <400> 11 atctcgagtt acttgtcatc gtcgtccttg tagtcagagg  
atgcacagag

50